

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE LOS VALLES**



**“Optimización de la producción de nanopartículas de plata a partir de  $\text{AgNO}_3$  e *inulina de agave*”**

**Tesis que para obtener el título de Doctora en Ciencias Físico Matemáticas con orientación en Nanociencias presenta:**

**MARÍA TERESA SÁNCHEZ VIEYRA**

**Director: Dr. David Omar Oseguera Galindo**

**Ameca, Jal., marzo de 2024**



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE LOS VALLES  
DOCTORADO EN CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

Ameca, Jalisco a 29 de enero 2024

Asunto: Carta de liberación de  
Tesis del director.

**Junta Académica del Programa  
Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas  
del Centro Universitario de los Valles**

**Presente**

En mi carácter de director del trabajo recepcional titulado:  
***“Optimización de la producción de nanopartículas de plata a partir de  
AgNO<sub>3</sub> e inulina de agave”***, que presenta la **Mtra. María Teresa Sánchez  
Vieyra** con código **220740884**, expongo que lo he revisado y que a mi juicio  
cumple con los requisitos metodológicos y de contenido, para que pueda ser  
sometida al examen recepcional correspondiente al Doctorado en Ciencias  
Físico Matemáticas con Orientación en Nanociencias.

Por lo antes expuesto, me permito emitir el presente oficio de liberación  
del trabajo recepcional, con la finalidad de que pueda llevarse a cabo la  
defensa de este.

**Atentamente  
“PIENSA Y TRABAJA”**

---

**Dr. David Omar Oseguera Galindo**  
Profesor investigador  
CUValles-UdeG



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de los Valles

COORDINACIÓN DEL DOCTORADO EN CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

CUV/DCFM/116/2024

**Dra. Suhey Ayala Ramírez**  
**Coordinadora de Posgrados**  
**CUVALLES**  
**Presente**

Por este medio se hace de su conocimiento que el trabajo de tesis titulado **“Optimización de la producción de nanopartículas de plata a partir de  $\text{AgNO}_3$  e inulina de agave”**, presentado por la alumna **Mtra. María Teresa Sánchez Vieyra** con código **220740884**, para obtener el grado académico de Doctora en Ciencias Físico Matemáticas con orientación en Nanociencias **SÍ CUMPLE** con los requerimientos establecidos en el Reglamento General de Posgrado, para su presentación del examen de grado, según consta en el acta **DCFM/02/2024** de sesión de la Junta Académica, celebrada el 8 de marzo de 2024.

Por tal motivo, le informamos que el examen de grado se efectuará el día viernes **22 de marzo de 2024** a las **12:00 hrs** en la **Sala de Posgrados del edificio CRECE del Centro Universitario de los Valles**. Al respecto le solicitamos atentamente la elaboración del acta correspondiente. Asimismo, le comunico sobre la designación del jurado de examen de grado.

Dr. Miguel Ojeda Martínez (Presidente)  
Dr. Sergio Yair Rodríguez Preciado (Secretario)  
Dr. David Omar Oseguera Galindo (**Director**) (Vocal)  
Dra. Brenda Esmeralda Martínez Zérega (Vocal)  
Dr. José Luis González Solís (Vocal)

Le agradezco su atención y me pongo a sus órdenes para cualquier información adicional.

Atentamente:  
“Piensa y Trabaja”

*“30 años de la Autonomía de la Universidad de Guadalajara y de su organización en Red”*

Ameca, Jalisco a 8 de marzo de 2024

**Dr. Marciano Sanchez Tizapa**  
Coordinador del Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO  
DE LOS VALLES  
Coordinación de Doctorado  
en Ciencias Físico Matemáticas



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de los Valles

COORDINACIÓN DEL DOCTORADO EN CIENCIAS FÍSICO MATEMÁTICAS

CUV/DCFM/114/2024

ASUNTO: Carta de revisión anti-plagio  
de trabajos recepcionales.

## H. Miembros de la Junta Académica del Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas Presente

Por este medio, me permito hacer de su conocimiento que el trabajo recepcional titulado **Optimización de la producción de nanopartículas de plata a partir de  $\text{AgNO}_3$  e inulina de agave**, realizado por la Mtra. **María Teresa Sánchez Vieyra**, con código **220740884** del Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas con Orientación en Nanociencias, fue revisado de manera previa a su presentación y defensa ante el jurado correspondiente, a través de la herramienta anti-plagio denominada Turnitin.

Con base en la revisión realizada por el director del trabajo recepcional y el análisis del reporte de las similitudes encontradas por dicho software, no se identificaron elementos originales contenidos en alguna obra de terceros que se hagan pasar como propios por el autor del trabajo recepcional <sup>1</sup>.

Por ello, se considera que el trabajo recepcional presentado es resultado del esfuerzo individual de su autor y que este empleó las normas y protocolos de citación pertinentes en su desarrollo, por lo cual, se presume que no infringe derechos intelectuales de terceros.

Sin otro particular por el momento, me despido con un cordial saludo.

Atentamente:

"Piensa y Trabaja"

*"30 años de la Autonomía de la Universidad de Guadalajara y de su organización en Red"*

Ameca, Jalisco a 8 de marzo de 2024

**Dr. Marciano Sanchez Tizapa**

Coordinador del Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
C. UNIVERSITARIO  
DE LOS VALLES  
Coordinación de Doctorado  
en Ciencias Físico Matemáticas

<sup>1</sup> Si bien el plagio como vulneración a los derechos intelectuales no se encuentra previsto en la legislación penal o en materia de propiedad intelectual, para efectos de su comprensión se recurre a la opinión doctrinista argentina Delia Lipszyc, quien señala se refiere al plagio como "el apoderamiento ideal de todos o de algunos elementos originales contenidos en la obra de otro autor presentándolo como propios". (Ref. Lipszyc Delia, cit. pos. Timal López Sandra y Sánchez Espinoza, Francisco. El plagio en el contexto del derecho de autor. Revista "Tla-melaua" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (online), 2017, vol. 11, n 42, pp 48-66. Disponible en :[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1870-69162017000200048&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1870-69162017000200048&lng=es&nrm=iso)

*Dedicado a*  
*Sahara Madai*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios y a mi familia por su amor y apoyo constante. En especial a mi hija Sahara Madaí Rosales Sánchez por su compañía, comprensión, sacrificios y sustento en cada momento que dediqué para llevar a cabo este proyecto.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo financiero para realizar el presente proyecto de investigación. Igualmente, al Centro Universitario de los Valles (CUVALLES) y la Universidad de Guadalajara (UdeG) por brindarme la oportunidad y el espacio para realizar mis estudios de doctorado.

Principalmente agradezco a mi director de tesis, el Dr. David Omar Oseguera Galindo, quien estuvo presente en todo momento para guiarme y corregirme cuando se requería, con la finalidad de lograr un mejor trabajo. Gracias por su constancia, enseñanzas, palabras de aliento y atinados consejos.

A los lectores revisores, doctora Brenda Esmeralda Martínez Zérega y doctores Miguel Ojeda Martínez, José Luis González Solís y Sergio Yair Rodríguez Preciado por sus valiosas aportaciones para la realización del presente trabajo de tesis y el artículo publicado, correspondiente a este mismo proyecto.

Al coordinador del doctorado Dr. Marciano Sánchez Tizapa por su disponibilidad y apoyo administrativo. También agradezco con cariño a la Dra. María Luisa Ojeda Martínez, que, en su momento, como coordinadora del doctorado, me apoyó para ingresar al posgrado.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología y al técnico Francisco Ruíz Medina por su apoyo para la caracterización con el Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	III
ÍNDICE DE TABLAS .....	VI
RESUMEN .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	7
2.1 Planteamiento del problema.....	7
2.2 Justificación .....	8
2.3 Hipótesis .....	9
2.4 Objetivos.....	9
2.4.1 Objetivo general .....	9
2.4.2 Objetivos específicos.....	9
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	11
3.1 Nanobiotecnología .....	11
3.2 Importancia de la plata y las nanopartículas de plata .....	12
3.3 Biosíntesis de nanopartículas de plata .....	14
3.4 Optimización de la bioproducción de nanopartículas de plata .....	21
3.4.1 Método de Optimización Tradicional.....	22
3.4.2 Metodología de Superficie de Respuesta .....	23
4. DETALLES EXPERIMENTALES .....	35
4.1 Optimización por Método Tradicional.....	35
4.1.1 Efecto de la <i>inulina de agave</i> en la síntesis.....	37
4.1.2 Efecto del AgNO <sub>3</sub> en la síntesis .....	38
4.1.3 Efecto de la temperatura en la síntesis .....	38
4.1.4 Efecto del pH en la síntesis .....	39
4.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata .....	39
4.3 Optimización por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR).....	40
4.4 Técnicas de caracterización .....	43

4.4.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible .....	43
4.4.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (MET) .....	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
5.1 Optimización por el método tradicional .....	47
5.1.1 Efecto de la <i>inulina de agave</i> en la síntesis.....	47
5.1.2 Efecto del AgNO <sub>3</sub> en la síntesis .....	48
5.1.3 Efecto de la temperatura en la síntesis .....	49
5.1.4 Efecto del pH en la síntesis .....	51
5.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata .....	55
5.3 Optimización por la Metodología de Superficie de Respuesta.....	58
6. CONCLUSIONES.....	76
REFERENCIAS .....	79
ANEXOS.....	90
ANEXO 1 – Cartel “Efecto de la Inulina de agave en la producción de nanopartículas de plata” .....	91
ANEXO 2 – Póster “Síntesis de nanopartículas de plata usando inulina de agave” .....	92
ANEXO 3 – Plática “Alta producción de nanopartículas de plata en inulina de agave y su efecto bactericida contra <i>Escherichia coli</i> ” .....	93
ANEXO 4 – Artículo publicado.....	94



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biosíntesis intracelular de nanopartículas de plata mediada por hongos (Modificado a partir de Santos, T. S, et al., 2021, p. 3).....	16
<b>Figura 2.</b> Biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata mediada por biomasa fúngica (Modificado a partir de Santos, T. S, et al., 2021, p. 4).....	16
<b>Figura 3.</b> Biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata mediada por extracto fúngico libre de células (Modificado a partir de Santos, T. S, et al., 2021, p. 4).....	17
<b>Figura 4.</b> Biosíntesis de nanopartículas de plata mediada por extracto acuoso de plantas.	18
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de formación de las NPs. (Modificado a partir de Mittal, et al., 2013, p. 348).....	18
<b>Figura 6.</b> Polímero de inulina (Modificado a partir de Barclay, et al., 2016, p. 32).....	20
<b>Figura 7.</b> Diseño factorial $2^k$ para $k=2$ y $k=3$ factores.....	26
<b>Figura 8.</b> Diseño central compuesto para $k=2$ y $k=3$ factores codificados (Myers & Anderson, 2016. p. 502). .....	27
<b>Figura 9.</b> Diseño factorial $3^k$ para $k=2$ y $k=3$ factores (Bezerra, et al., 2008, p. 970).....	28
<b>Figura 10.</b> Diseño Box-Benhken para tres factores codificados (Myers & Anderson, 2016. p. 504).....	29
<b>Figura 11.</b> Naturaleza secuencial de la MSR (Myers & Anderson, 2016. p. 480). .....	30
<b>Figura 12.</b> Superficies de respuesta cuadráticas para dos factores $x_1$ y $x_2$ . (a) máximo, (b) meseta, (c) máximo fuera de la región experimental, (d) mínimo y (e) punto de silla. (Bezerra, et al., 2008. p. 969). .....	34
<b>Figura 13.</b> Espectros de absorción UV-Vis de AgNPs (a) suspendidas en agua destilada (Modificado a partir de Oseguera, et al., 2018), (b) de diferentes tamaños (Sánchez, 2020, p. 29).....	36
<b>Figura 14.</b> Conjunto de muestras para la síntesis de AgNPs variando 1) <i>inulina de agave</i> ; 2) $AgNO_3$ ; 3) temperatura y 4) pH. ....	37
<b>Figura 15.</b> Espectrofotómetro UV-Vis de haz sencillo GENESYS 150 marca Thermo Scientific (Sánchez, 2020, p. 42).....	44
<b>Figura 16.</b> Esquema básico de un espectrofotómetro UV-Vis de haz sencillo (Sánchez, 2020, p. 41).....	45

<b>Figura 17.</b> Microscopio electrónico de transmisión JOEL JEM-2010 (Sánchez, 2020, p. 44). .....	46
<b>Figura 18.</b> Absorbancia UV-Vis de nanopartículas obtenidas usando diferentes concentraciones de <i>inulina de agave</i> . ....	48
<b>Figura 19.</b> Absorbancia UV-Vis de nanopartículas obtenidas usando diferentes concentraciones de AgNO <sub>3</sub> . ....	49
<b>Figura 20.</b> Absorbancia UV-Vis de nanopartículas obtenidas usando diferentes temperaturas. .....	50
<b>Figura 21.</b> (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas, la b, c y d) de AgNPs obtenidas con una temperatura de 75 °C. ....	51
<b>Figura 22.</b> Absorbancia UV-Vis de las nanopartículas obtenidas utilizando diferentes valores de pH. ....	52
<b>Figura 23.</b> (a) Espectros UV-Vis de nanopartículas obtenidas con un pH=12 utilizando diferentes soluciones en agua destilada. (b) línea de calibración de absorbancia máxima vs concentración de inulina de agave. ....	53
<b>Figura 24.</b> (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas b, c y d) de AgNP obtenidas con pH=11. ....	54
<b>Figura 25.</b> (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas b, c y d) de AgNP obtenidas con pH=10. ....	54
<b>Figura 26.</b> (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas b, c y d) de AgNP obtenidas con pH=12 (muestra S1 <sub>bac</sub> ). .....	56
<b>Figura 27.</b> Tubos para estudiar el efecto bactericida de las AgNPs. 1) Control positivo: medio LB. 2) Control negativo: medio LB y 100 µL de <i>E. coli</i> . 3) Medio LB, 100 µL de <i>E. coli</i> y 100 µL de <i>inulina de agave</i> . 4) Medio LB, 100 µL de <i>E. coli</i> y 100 µL de AgNPs (S1 <sub>bac</sub> ). 5) Medio LB, 100 µL de <i>E. coli</i> y 100 µL de AgNPs (S2 <sub>bac</sub> ). 6) Medio LB, 100 µL de <i>E. coli</i> y 100 µL de <i>inulina de agave</i> . ....	57
<b>Figura 28.</b> Absorbancia UV-Vis de las AgNPs biosintetizadas en los 4 experimentos adicionales, con valores altos de pH y mínimas concentraciones de <i>inulina de agave</i> y de AgNO <sub>3</sub> . ....	59

<b>Figura 29.</b> (a) Absorbancia UV-Vis de las AgNPs sintetizadas en el E2P con 5 mg/mL de <i>inulina de agave</i> , 0.1 mM de AgNO <sub>3</sub> y pH=12. (b) Datos de su máxima absorbancia en función del tiempo. ....	60
<b>Figura 30.</b> Fotografía de los 29 experimentos sugeridos por el diseño Box-Benhken.....	61
<b>Figura 31.</b> Absorbancia UV-Vis de las AgNPs sintetizadas en los 29 experimentos efectuados el día de su preparación. ....	63
<b>Figura 32.</b> Gráfica de (a) probabilidad normal de los residuos, (b) valores de respuesta experimentales vs valores pronosticados, (c) valores pronosticados vs residuales y (d) corridas vs residuales.....	68
<b>Figura 33.</b> Gráfica de perturbación de los factores concentración de <i>inulina de agave</i> (A), concentración del AgNO <sub>3</sub> (B), pH (C) y temperatura (D).....	70
<b>Figura 34.</b> (a) Gráfica de contornos y (b) Gráfica de superficie de respuesta de la concentración del AgNO <sub>3</sub> (B) y el pH (C) sobre la absorbancia de las AgNPs. Para estas gráficas los factores <i>inulina de agave</i> y temperatura se mantuvieron constantes a 5 mg/mL y 61.5°C respectivamente. ....	71
<b>Figura 35.</b> Absorbancia UV-Vis de los 29 experimentos, del día de la síntesis y 4 meses después. ....	74
<b>Figura 36.</b> Absorbancia UV-Vis del experimento 6, cuatro meses después de su preparación. ....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar el efecto de la <i>inulina de agave</i> en la síntesis de AgNPs. ....	38
<b>Tabla 2.</b> Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar el efecto del AgNO <sub>3</sub> en la síntesis de nanopartículas de plata.....	38
<b>Tabla 3.</b> Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para analizar el efecto de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de plata.....	39
<b>Tabla 4.</b> Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar el efecto del pH en la síntesis de nanopartículas de plata.....	39
<b>Tabla 5.</b> Valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar efecto bactericida. ....	40
<b>Tabla 6.</b> Contenido de los tubos de ensayo para estudiar la actividad antibacteriana. ....	40
<b>Tabla 7.</b> Factores experimentales con sus correspondientes tres niveles del Diseño Box-Benhken. ....	41
<b>Tabla 8.</b> Diseño de experimentos Box-Benhken obtenido con Design-Expert 7.0.0, considerando una variable de respuesta, cuatro factores experimentales y 5 puntos centrales. ....	42
<b>Tabla 9.</b> Absorbancias máximas del experimento original y sus diluciones.....	53
<b>Tabla 10.</b> Diseño Box-Benhken de la superficie de respuesta y resultados de los experimentos realizados. ....	64
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para el primer ajuste del modelo cuadrático del diseño Box-Benhken. ....	66
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo mejorado del diseño Box-Benhken. ....	67
<b>Tabla 13.</b> Comparativo de absorbancias de los experimentos del día de la síntesis y 4 meses después. ....	72

## RESUMEN

Mediante un método amigable con el medio ambiente y de bajo costo se sintetizaron nanopartículas de plata coloidales en una solución de *inulina de agave*. Las nanopartículas fueron de geometría cuasi esférica, y en su mayoría, con tamaño menor a 10 nm. Además, a través del método de optimización tradicional y la Metodología de Superficie de Respuesta se encontraron condiciones idóneas para obtener altas concentraciones de nanopartículas. En el estudio de ambos métodos se analizaron los efectos de los factores experimentales; concentración de *inulina de agave*,  $\text{AgNO}_3$ , temperatura y pH en la síntesis mediante espectroscopía UV-Vis y MET.

Todos los factores experimentales influyeron en la producción de las nanopartículas. A mayores concentraciones tanto de *inulina de agave* como de  $\text{AgNO}_3$  se da una mayor formación. Por otra parte, a temperaturas mayores a  $60^\circ\text{C}$  se acelera la formación, pero no tan notablemente como cuando se tienen valores de pH elevados. Es decir, el pH tuvo un efecto predominante en la tasa de formación, y por ende, en la producción de una mayor cantidad de nanopartículas en el menor tiempo. Del tal modo que, con  $\text{pH}=12$  se logró la máxima celeridad en la producción, lo cual además llevó a la formación de nanopartículas con la distribución de tamaños más estrecha.

La muestra de nanopartículas preparada con 60 mg/mL de *inulina de agave*, 10 mM de  $\text{AgNO}_3$ ,  $T=23^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=12$  y un tiempo de almacenamiento de 40 minutos, mostró un efecto bactericida significativo sobre la cepa de *E. coli*.

## ABSTRACT

Colloidal silver nanoparticles were synthesized using *agave inulin* solution using an eco-friendly and low-cost method. The nanoparticles had a quasi-spherical geometry, and most of them with a size less than 10 nm. Furthermore, through the traditional optimization method and the Response Surface Methodology, ideal conditions were found to obtain high nanoparticle concentration. Effects of experimental factors such as concentration of *agave inulin*, AgNO<sub>3</sub>, temperature and pH were analyzed. The characterization of nanoparticles was by UV-Vis spectroscopy and MET.

All experimental factors influenced in the production of the nanoparticles. At higher concentrations of *agave inulin* and AgNO<sub>3</sub>, greater formation occurs. On the other hand, at temperatures above 60°C the formation is accelerated, but not as noticeable as when there are high pH values. That is, pH had a predominant effect on the formation rate, and therefore, it influenced the production of a greater number of nanoparticles in the shortest time. Thus, with pH=12, the maximum speed in production was achieved, which also led to the formation of nanoparticles with the narrowest size distribution.

The nanoparticle sample prepared with 60 mg/mL of *agave inulin*, 10 mM of AgNO<sub>3</sub>, T=23°C, pH=12 and a storage time of 40 minutes, showed a significant bactericidal effect on the *E. coli* strain.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La plata es un metal precioso conocido comúnmente por su uso en la joyería y en la fabricación de monedas y utensilios. Sin embargo, por su poder desinfectante, sus usos más arcaicos e importantes han sido para fines higiénicos y médicos. En la antigüedad almacenaban agua o vino en vasijas de plata con el fin de prolongar sus buenas condiciones. Además, se empleaba el polvo de plata para la curación de heridas y tratamiento de úlceras y quemaduras. Posteriormente, en el siglo XIX se reconoció la actividad antimicrobiana del nitrato de plata, no obstante, con el surgimiento de los antibióticos se vio notablemente disminuido su uso para tal fin (Das, *et al.*, 2020; Oroz, M. M., 2009).

Actualmente, gracias a la nanotecnología, se han podido fabricar nanopartículas de plata (AgNPs), estudiar, dilucidar y aprovechar sus interesantes propiedades. La reducción de tamaño a escala nano, que conlleva un área superficial alta y confinamiento cuántico, entre otros efectos, ocasiona importantes cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de las partículas de dicho metal en comparación con las propiedades que presenta la plata en bulto (Abou El-Nour, *et al.*, 2010).

Las AgNPs, en función de su tamaño, presentan diferente luminiscencia, actividad catalítica (Calvo, 2017), propiedades electromagnéticas y ópticas (Abou El-Nour, *et al.*, 2010). Asimismo, se ha mostrado que poseen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y anticoagulantes (Arif, R., & Uddin, R., 2021), lo cual les confiere un alto potencial para aplicaciones biomédicas y en muchas otras áreas.

Por su gran poder antimicrobiano contra una amplia gama de bacterias, hongos y virus, estas nanopartículas son atractivas para la purificación y tratamiento del agua (Sharma, R., 2021), la productividad agrícola (Sharma, *et al.*, 2012; Gupta, N., *et al.*, 2018), envasado de productos alimenticios protegidos contra patógenos (Siddiqi, Husen y Rao 2018), recubrimiento de instrumentos y productos médicos como bisturís, agujas y catéteres venales, urinarios y de drenaje (Chernousova y Epple 2013) y curación de heridas infectadas (Ye, *et al.*, 2016). También, por sus propiedades eléctricas, ópticas y térmicas se han utilizado en la fabricación de biosensores y biomarcadores para el diagnóstico oportuno de

enfermedades, administración de fármacos y obtención de imágenes, mediante la detección de especies químicas, orgánicas, inorgánicas y biológicas (Tan, *et al.*, 2021; Calvo, 2017; Oseguera, 2012; García, 2012; Oroz, M. M., 2009).

En el área de la salud se desea aprovechar la actividad bactericida de este nanomaterial para hacer frente al aumento de nuevas cepas bacterianas resistentes a la mayoría de los antibióticos potentes (Morones, *et al.*, 2005). Consecuentemente, existen trabajos donde muestran que las AgNPs presentan interacción directa con bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Escherichia coli* (Hosnedlova, *et al.*, 2022; Parvekar, *et al.*, 2020; Lu, *et al.*, 2012; Morones, *et al.*, 2005) Igualmente, se ha evaluado y probado un efecto bactericida positivo de estas nanopartículas en combinación con antibióticos como la penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina en contra de cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Shahverdi, A., *et al.*, 2007).

En vista de las cuantiosas aplicaciones que pueden tener las AgNPs, existe en la literatura una gran cantidad de trabajos dedicados a su síntesis. Para la fabricación de nanopartículas existen métodos con enfoques bottom-up (de abajo hacia arriba) y top-down (de arriba hacia abajo), clasificación dada según el tipo de ensamblaje del nanomaterial. En el primer enfoque se forman las nanopartículas a partir del ensamblaje de componentes más pequeños de dimensiones atómicas o moleculares. Mientras que en el enfoque de top-down se comienza el proceso a partir de una pieza grande, superior a la escala nanométrica, y posteriormente, mediante herramientas cada vez más finas se crean estructuras más pequeñas hasta formar el nanomaterial (Arole, V. M. y Munde, S. V., 2014).

Los principales métodos con enfoque top-down son físicos y los de bottom-up químicos. Además, mientras que los primeros suelen ser costosos debido a que requieren de instrumentación compleja y complicada, así como alto consumo de energía, los segundos suelen iniciar con la reducción de los iones metálicos a átomos metálicos, seguido por la agregación controlada de estos átomos, lo cual los hace más convenientes para la formación de nanopartículas más pequeñas y uniformes (Zanella, R., 2012).

Se han logrado producir AgNPs estables por ambos enfoques (top-down y bottom-up) y diversos métodos de síntesis. La importancia de cada uno de ellos recae en la obtención



de nanopartículas con características deseables para aplicaciones específicas. Así que, se han obtenido estas nanopartículas por métodos físicos, químicos y biológicos, entre los cuales se incluyen: ablación láser, irradiación gamma, irradiación de electrones, reducción química, métodos fotoquímicos, procesamiento de microondas y métodos biológicos (Iravani, S., *et al.*, 2014).

Los métodos biológicos, conocidos también como métodos de síntesis verde tienen un enfoque bottom-up y se fundamentan en el método de reducción química. Consisten en la disolución de sal de plata con compuestos orgánicos, encargados de reducir los iones plata a estado neutro para la posterior formación de las nanopartículas y de mantenerlas en una suspensión estable dentro del medio líquido. En el caso de la reducción química se emplean reactivos químicos en lugar de compuestos orgánicos, como agentes reductores y estabilizadores. Este hecho hace que los métodos biológicos, en comparación con los de reducción química, sean de protocolos más seguros, de baja o nula toxicidad, compatibles con el medio ambiente, económicos y sencillos (Singh, *et al.*, 2018).

Gracias a las ventajas que representan los métodos biológicos, se han incrementado los trabajos de síntesis de AgNPs a través de esta ruta. Para ello se han utilizado diversas plantas, frutos, semillas, bacterias y hongos, debido a que ciertas biomoléculas tienen la capacidad de reducir los iones metálicos (Yaqoob, A. A., *et al.*, 2020; Ahmad, S., *et al.*, 2019). En este trabajo se utilizó la *inulina de agave* como agente biológico reductor de los iones metálicos  $Ag^+$  a  $Ag^0$ . La *inulina de agave* es un polisacárido formado por unidades de fructosa obtenido de las piñas del agave (Justo, *et al.*, 2001), que es no tóxico, indigerible por los humanos y con alta solubilidad (Barclay, *et al.*, 2016). También tiene capacidad reductora, y en disolución con agua presenta cierta viscosidad que podría ayudar a la estabilidad de las nanopartículas suspendidas en el líquido.

Entre las bondades de producir AgNPs por métodos biológicos es que se pueden obtener nanopartículas de tamaños muy pequeños, estables por largos periodos de tiempo, mediante protocolos seguros y de baja toxicidad, convenientes para usos bactericidas en el área biomédica (Bar, *et al.*, 2009). De acuerdo con Siddiqui, *et al.* (2018) y Sánchez (2017), la actividad bactericida de las AgNPs puede cambiar con sus características físicas, como forma y tamaño. Según Sánchez (2017), a menor tamaño de las AgNPs mayor es su

superficie de contacto, lo cual favorece una mejor actividad bactericida. De acuerdo con Morones, *et al.* (2005) un tamaño adecuado de las AgNPs para tal fin oscila entre 1 y 10 nm de diámetro. Además, Ma, *et al.* (2017) y Maldonado, *et al.* (2021) mencionan que otro factor importante es la concentración de las AgNPs.

Las características deseadas ya mencionadas, así como la polidispersidad de las AgNPs pueden ser modificadas o controladas por factores experimentales como: pH y temperatura de la solución, concentración del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), concentración del compuesto biológico y tiempo de almacenamiento (Barabadi, *et al.*, 2019; Nayak, *et al.*, 2011). Por este motivo muchos investigadores se han interesado en explorar los efectos de dichos factores experimentales sobre algunas de las características deseadas. Tales estudios los han hecho principalmente por el método de optimización tradicional, conocido también como “método de una sola variable”.

Aunque con el método tradicional se pueden analizar los efectos de cada factor, no es posible conocer los efectos de las interacciones entre ellos, por lo tanto, no se pueden detectar los efectos completos sobre las características deseadas de las nanopartículas. Además, por este método, entre mayor sea la cantidad de factores y los niveles de estos, mayor será la cantidad de experimentos que se tengan que hacer. Consecuentemente, mayores serían los gastos y el tiempo requerido para el estudio.

Mientras tanto, con la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) se puede realizar la optimización considerando el efecto de todos los factores y sus posibles interacciones. Además, acompañando la MSR con un diseño de experimentos adecuado, se pueden reducir al mínimo posible la cantidad de experimentos necesarios, reduciendo costos y tiempo. La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para ajustar una relación funcional adecuada entre la respuesta de interés y un conjunto de factores, con la finalidad de conocer el comportamiento de la respuesta en función de los factores, y a partir de ello realizar predicciones sobre la respuesta (Khuri y Mukhopadhyay, 2010). Esta metodología es muy útil cuando en un proceso o sistema, una o varias características o respuestas están influenciadas por diversos factores y se requiere conocer el valor o nivel de los factores que optimizan la respuesta para lograr el mejor rendimiento en el proceso o sistema (Bezerra, *et al.*, 2008).

Por las ventajas mencionadas, actualmente se está trabajando la optimización en la fabricación de nanopartículas de plata mediante la MSR. De acuerdo con Chowdhury, *et al.* (2016), ellos presentaron el primer trabajo de optimización para mejorar el rendimiento de la producción de AgNPs esféricas utilizando la MSR. En su caso sintetizaron AgNPs por el método de reducción química y optimizaron la producción de las NPs analizando estadísticamente tres factores: concentraciones de AgNO<sub>3</sub>, citrato trisódico y tiempo de agitación. Concluyeron que todos los factores, excepto el tiempo de agitación, contribuyeron significativamente a la producción. Mas recientemente, por el mismo método químico, Qintero, *et al.* (2019) optimizaron el tamaño medio de las AgNPs, el pico de mayor intensidad en la distribución de tamaños, la polidispersidad y el rendimiento del proceso estudiando cuatro parámetros en la síntesis: concentración de AgNO<sub>3</sub>, concentración de citrato de sodio (TSC), concentración de NaBH<sub>4</sub> y el pH de la reacción.

Para el caso de la optimización en la fabricación de AgNPs por reducción biológica mediante la MSR existen menos artículos publicados, ya que es un área que apenas se está explorando. Uno de esos trabajos es el de Barabadi, *et al.* (2019), quienes optimizaron el diámetro promedio de AgNPs biosintetizadas con el hongo *Penicillium Citrinum* mediante la MSR y el diseño de experimentos Box-Behnken (DBB). Ellos estudiaron los efectos de cinco factores: concentración de AgNO<sub>3</sub>, pH de la solución, temperatura de la incubadora agitadora, tasa de agitación de la incubadora y tiempo de incubación. Y concluyeron que el análisis multivariado que conlleva la metodología facilitó encontrar las condiciones óptimas para la biosíntesis de las NPs. También, Othman, *et al.* (2021) biosintetizaron AgNPs, pero lo hicieron mediante el hongo *Aspergillus terreus* NRRL265. Analizaron el efecto de cuatro factores que podrían influir en la biosíntesis de las NPs: volumen de la solución del hongo, concentración molar del AgNO<sub>3</sub>, tiempo de reacción y pH. Mediante el diseño de experimentos central compuesto (DCC) eligieron cinco niveles para cada factor formando en total treinta experimentos que incluían 6 puntos centrales. Estudiaron los efectos de las interacciones de cada factor y dedujeron el factor que más influyó en la síntesis. Por su parte, Azmi, *et al.* (2021) biosintetizaron AgNPs usando extracto de hoja de *Boswellia sacra*. Mediante la MSR y el DBB buscaron las condiciones óptimas para un mayor rendimiento en la producción de las NPs. Estudiaron los efectos de tres factores: concentración del extracto, concentración de AgNO<sub>3</sub> y la temperatura y encontraron los valores óptimos con

un modelo de ajuste muy adecuado de acuerdo con el análisis ANOVA. Prema, *et al.* (2022) biosintetizaron AgNPs con extracto de té verde y optimizaron mediante un DCC el tamaño de la NP sintetizada, su absorbancia UV, potencial zeta e índice de polidispersidad. Para ello, estudiaron los efectos de los siguientes parámetros experimentales: concentración de AgNO<sub>3</sub>, concentración de extracto y temperatura.

Actualmente no se ha reportado la síntesis de AgNPs usando la *inulina de agave*, la cual tiene propiedades reductoras que la hacen efectiva para tal fin, que, además es abundante en la región de Jalisco, es económica y completamente amigable con el medio ambiente. Por tal motivo, en el presente trabajo se sintetizaron AgNPs usando este compuesto biológico como agente reductor y estabilizador. Siendo el objetivo principal estudiar los efectos de factores experimentales como concentración de *inulina de agave*, concentración del AgNO<sub>3</sub>, pH y temperatura en la producción o tasa de formación de las NPs. La comparación de la producción de NPs bajo distintas condiciones de síntesis se hizo mediante las absorbancias máximas de las AgNPs alrededor de los 400 nm, con fundamento en la ecuación lineal de Lambert-Beer, debido a que se puede asociar la absorbancia con la concentración de las AgNPs. Además, se realizó una estimación teórica de la mayor concentración de AgNPs producidas y se analizó su efecto bactericida sobre la bacteria *E. coli*. Para la estimación teórica se tomó en cuenta un artículo sobre consideraciones teóricas en la producción de nanopartículas de plata por ablación láser confinada en agua destilada (Oseguera *et al.*, 2018).

La optimización de la producción de AgNPs se realizó tanto por el método tradicional como por la MSR. Ambos procesos arrojaron resultados similares, pero por la MSR se obtuvo información sobre la interacción de los factores experimentales y su influencia en la producción de las AgNPs.

## CAPÍTULO 2

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 Planteamiento del problema

El método de síntesis verde se fundamenta en el método de reducción química, pero en lugar de usar reactivos químicos, se utilizan compuestos orgánicos para la reducción de los iones metálicos y para la estabilización de las nanopartículas suspendidas en un medio líquido. En el año 2003 se publicó por primera vez un artículo sobre síntesis verde de AgNPs, en el que se utilizó sal de  $\text{AgNO}_3$  como precursor de la plata sobre tejido de la planta de alfalfa, el cual redujo los iones  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$  y favoreció la formación de las nanopartículas (Gardea, *et al.*, 2003). A partir de ese año se han incrementado las publicaciones de artículos científicos sobre síntesis verde de estas nanopartículas.

Los trabajos publicados sobre biosíntesis de AgNPs principalmente se enfocan en la preparación de las nanopartículas en medios acuosos, con el fin de facilitar su estudio y aplicación. Para ello, se han utilizado diferentes extractos e infusiones de plantas y de frutos como agentes reductores y estabilizadores. En tal caso, las AgNPs obtenidas son caracterizadas comúnmente por espectrofotometría UV-Vis, con el propósito de evidenciar su formación y algunas otras características como forma, tamaño y cinética de formación, mediante el análisis de espectros de absorción, tanto en el día de la síntesis como a lo mucho después de unas cuantas semanas de su preparación (Edison y Sethuraman, 2012; Krishnaraj *et al.*, 2010). Sin embargo, poco se ha tratado el tema de la cantidad producida de nanopartículas estables por períodos de tiempo más prolongados, siendo una característica deseable para aplicaciones específicas. Incluso, en la literatura revisada sobre biosíntesis no hay artículo que mencione el número de nanopartículas obtenidas.

Por otra parte, no se ha realizado la síntesis de AgNPs mediante *inulina de agave*, a excepción de la tesis de maestría “Estudio de condiciones físicas y químicas en la biosíntesis de nanopartículas de plata usando infusión de chía (*Salvia hispanica*) e *inulina de agave*” (Sánchez, 2020) en la que se sugiere profundizar más en las condiciones de síntesis. Esto

significa que falta por hacer más experimentos con el propósito de sugerir condiciones experimentales óptimas que permitan una mejor y mayor producción de AgNPs mediante *inulina de agave*. Por este motivo, se requiere hacer un estudio de optimización de la producción de AgNPs que disminuya gastos, tiempo y trabajo, pero a la vez dé como resultado una alta producción de AgNPs con características deseables. Esto es posible mediante procesos de síntesis verde, ya que son económicos, sencillos y amigables con el medio ambiente.

## **2.2 Justificación**

Al momento no se han estudiado a detalle las condiciones de síntesis de AgNPs mediante *inulina de agave*, un producto eficiente en la producción de estas nanopartículas con tamaños muy pequeños y estables por largos periodos de tiempo. Vale la pena profundizar en la síntesis con este producto biológico debido a que es abundante en la región de Jalisco, lo que lo hace muy accesible y económico.

Por otra parte, se sabe que diversas características de las AgNPs, como forma, tamaño y concentración, pueden ser controladas mediante factores experimentales en el proceso de síntesis. Algunos de esos factores son: la concentración del compuesto biológico y de la sal metálica, la temperatura, el pH y el tiempo de reacción (Barabadi, *et al.*, 2019). Existen trabajos donde efectúan la optimización en la síntesis de estas nanopartículas, pero en su mayoría son por métodos tradicionales “de un factor a la vez” donde se varía un parámetro mientras el resto se mantienen constantes. Sin embargo, la desventaja de este método es que no se obtiene información completa sobre la interacción entre los factores y el número de experimentos requeridos puede ser muy grande.

La Metodología de Superficie de Respuesta, que se utiliza en este trabajo, es un método de optimización reciente en la producción de AgNPs, la cual tiene la ventaja de dar información más completa sobre los efectos de la interacción de los factores. Además, mediante la elección de un diseño de experimentos adecuado se pueden preparar la cantidad de experimentos esenciales para obtener buenos resultados de optimización. Esto garantiza una disminución de recursos, tiempo y trabajo. Además, con esta metodología se puede obtener un modelo matemático que ayude a predecir o identificar los valores de cada factor que originan valores óptimos para la característica estudiada en las nanopartículas. En

particular, a la fecha, no existe trabajo donde se optimice la concentración de AgNPs mediante la MSR utilizando *inulina de agave* para la producción de las nanopartículas.

## **2.3 Hipótesis**

Con el método tradicional y la Metodología de Superficie de Respuesta se obtendrá información sobre los parámetros y las cantidades idóneas para una mayor producción de nanopartículas de plata, a partir de la reacción entre la *inulina de agave* y la sal de nitrato de plata.

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1 Objetivo general**

Optimizar la producción de nanopartículas de plata utilizando *inulina de agave* como reactante y nitrato de plata como reactivo.

### **2.4.2 Objetivos específicos**

- Estudiar, mediante el método tradicional, los efectos de la concentración del AgNO<sub>3</sub>, concentración de la *inulina de agave*, temperatura y pH en la producción de las AgNPs.
- Con base en los resultados del método tradicional, obtener los niveles de cada factor experimental y seleccionar un diseño de experimentos adecuado para optimizar la producción de nanopartículas mediante la MSR.
- Realizar en el laboratorio los experimentos indicados por el diseño seleccionado y medir sus absorbancias UV-Vis.
- Siguiendo la MSR, hacer un tratamiento estadístico de los datos experimentales recolectados y encontrar un modelo matemático para optimizar la producción de nanopartículas de plata.
- Validar el modelo matemático obtenido.
- Caracterizar las muestras de AgNPs obtenidas mediante Espectrofotometría UV-Vis y Microscopía Electrónica de Transmisión.

- Estudiar el efecto de las AgNPs obtenidas en la bacteria *E. coli*.



## CAPÍTULO 3

### FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1 Nanobiotecnología

La nanotecnología se encarga del diseño, la creación y la aplicación de nuevos materiales y dispositivos que cuentan con al menos una dimensión en escala nanométrica, entre 0.2 y 100 nm, aproximadamente. Ejemplos de ellos son las nanopartículas, nanotubos, nanocables, nanoporos, etcétera. En estos materiales, conocidos como nanomateriales, aparecen nuevas y mejoradas propiedades físicas, químicas, mecánicas y ópticas (Poulose, S., *et al.*, 2014). Por tal motivo, se han realizado numerosas investigaciones que han llevado a importantes avances en diversos campos como el cuidado del medio ambiente, la medicina, la electrónica, los alimentos (Morais, *et al.*, 2014), la informática, imágenes, impresión, catálisis, cosméticos, textiles, etcétera (Cardoso P., 2016).

Una de las tantas aplicaciones de los nanomateriales es en el área biológica, incluyendo la salud, la farmacéutica y la medicina, para diagnósticos, terapias, entrega de medicamentos, detección de patógenos y seguridad alimenticia (Morais, *et al.*, 2014). La inclusión de estos nanomateriales en el área biológica dio origen a la nanobiotecnología, conocida también como biotecnología de oro. Esta área se encarga de desarrollar y aplicar nanomateriales para el estudio de fenómenos biológicos (Barabadi, H., 2017). Una característica importante que hace útiles a los nanomateriales en esta área es que la mayor parte de la biología se produce en escala nanométrica y el tamaño de estos nanomateriales es similar a componentes biológicos. Por ejemplo, son de tamaño similar a organelos que se encuentran al interior de las células (Morais, *et al.*, 2014).

La nanobiotecnología profundiza en el estudio de la interacción entre estructuras intracelulares y nanomateriales, especialmente con nanopartículas (nanomateriales con sus tres dimensiones en escala nanométrica). Por consiguiente, es de sustancial interés el desarrollo y la aplicación de nanopartículas para fines farmacéuticos y biológicos. Los avances en esta área podrían proporcionar nuevos conocimientos sobre la prevención, el

diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, mediante la identificación de los nanomateriales más eficientes y sus mecanismos de acción en conjunto con los fármacos (Singh, Manikandan y Kumaraguru, 2011).

La biosíntesis o síntesis verde se ha convertido en una ruta atractiva en la nanobiotecnología para fabricar nanopartículas con aplicaciones biológicas y médicas, debido a que el nanomaterial es obtenido con procedimientos ecológicos y no tóxicos. Con este método se utiliza una gran variedad de biomoléculas naturales capaces de formar nanopartículas (Dahoumane, *et al.*, 2017). En particular, el uso de extractos de plantas en la síntesis de nanopartículas metálicas en suspensión acuosa es de especial interés porque consiste en procedimientos relativamente simples en los que componentes de la planta actúan como agentes reductores de los iones metálicos y a la vez son capaces de mantener estables las nanopartículas metálicas durante un tiempo prolongado (Barabadi, H., 2017; Poulouse, S., *et al.*, 2014).

### **3.2 Importancia de la plata y las nanopartículas de plata**

La plata es un metal dúctil de color blanco con brillo metálico, que por su apariencia y otras propiedades se ha utilizado para la fabricación de varios objetos como joyas, monedas, utensilios, espejos, etcétera. Este metal posee alta conductividad eléctrica y térmica, pero baja resistencia de contacto. Es un elemento que se presenta naturalmente en forma pura y su concentración promedio en el agua es de 0.5 ppm, mientras que su concentración en el suelo es de aproximadamente 10 ppm (Biswas y Dey, 2015). Su número atómico es 47, con estado de oxidación más común de  $1^+$  y menos común de  $2^+$ .

Entre sus usos más importantes se encuentran los que son con fines higiénicos y médicos. Desde la antigüedad, este material se empleaba principalmente para la desinfección de agua. Utilizaban vasijas de plata para almacenar agua o vino con el fin de prolongar sus buenas condiciones (Oroz, M. M., 2009). En su caso, los fenicios colocaban monedas de plata como conservantes en sus jarras de agua. En el siglo XVII se utilizó el polvo de plata con fines medicinales, entre ellos, para el tratamiento de úlceras. En el siglo XIX se reconoció la actividad antimicrobiana del nitrato de plata, y entre otros usos, los médicos lo empezaron a emplear para la prevención de conjuntivitis en los recién nacidos por medio de

gotas oculares y para el tratamiento de quemaduras a través de las cremas de sulfadiazina (Biswas y Dey, 2015; Cardoso P., 2016). Posteriormente, con el surgimiento de los antibióticos en el siglo XX el uso del nitrato de plata disminuyó. Sin embargo, la desventaja actual de los antibióticos es que ha aumentado ampliamente la resistencia a los mismos (Das, *et al.*, 2020). Por este motivo, la búsqueda de un eficiente agente antimicrobiano se ha vuelto una importante tarea en la medicina.

Gracias a la nanotecnología, se ha encontrado que al reducir la plata a partículas de tamaño nanométrico su actividad antimicrobiana se incrementa drásticamente, al igual que muchas otras propiedades que se ven mejoradas. La reducción de tamaño a escala nano, que conlleva un área superficial alta, confinamiento cuántico, entre otros efectos, ocasiona importantes cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas de las partículas de dicho metal en comparación con las propiedades que presenta la plata en bulto (Abou El-Nour, *et al.*, 2010).

Actualmente las AgNPs están dentro de las nanopartículas metálicas más importantes y estudiadas en la nanobiotecnología debido a su actividad antimicrobiana y sus diversas aplicaciones en áreas biológicas. Si bien es cierto que estas nanopartículas también exhiben propiedades ópticas y eléctricas únicas que se ha aprovechado en el área médica, han sido mayormente aprovechadas sus propiedades antibacterianas (Biswas y Dey, 2015). De tal manera, que se han utilizado contra una amplia gama de bacterias en herramientas quirúrgicas, de manipulación de alimentos, envasado y almacenamiento, purificadores de agua, textiles, cosméticos, estuches para lentes de contacto, productos para el cuidado de heridas, implantes, vendajes, juguetes para niños, etcétera (Sharma, R., 2021; Gupta, N., *et al.*, 2018; Siddiqi, Husen y Rao 2018; Ye, *et al.*, 2016; Biswas y Dey, 2015; Chernousova y Epple 2013; Sharma, *et al.*, 2012).

Existen trabajos donde muestran que AgNPs con ciertas características físicas son agentes efectivos contra bacterias como: *Staphylococcus aureus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Escherichia coli* (Hosnedlova, *et al.*, 2022; Parvekar, *et al.*, 2020; Lu, *et al.*, 2012; Morones, *et al.*, 2005). También, se ha evaluado y probado un efecto bactericida positivo de estas nanopartículas en combinación con antibióticos como la penicilina G, amoxicilina, eritromicina, clindamicina y vancomicina en contra de cepas

bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Shahverdi, A., *et al.*, 2007).

Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de las AgNPs contra las bacterias, se ha identificado que estas son capaces de ingresar y ubicarse tanto en el interior como en la membrana celular bacteriana e inhibir su replicación y provocar su muerte. Se cree que las nanopartículas tienden a ubicarse en ciertas partes de la célula que contienen azufre y fósforo, tal como en las proteínas de la membrana y en el ADN del interior de la célula, por la afinidad del nanomaterial con estos elementos. De esta manera, las nanopartículas causan cambios en la morfología de la membrana bacteriana y dañan el ADN desencadenando en problemas respiratorios y división celular, provocando finalmente la muerte de la célula (Morones, *et al.*, 2005).

Otras propiedades de las AgNPs que están siendo estudiadas son: las antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y anticoagulantes (Arif, R., & Uddin, R., 2021). Además, por sus propiedades eléctricas, ópticas y térmicas, se han utilizado en la fabricación de biosensores y biomarcadores para el diagnóstico oportuno de enfermedades, administración de fármacos y obtención de imágenes, mediante la detección de especies químicas, orgánicas, inorgánicas y biológicas (Tan, *et al.*, 2020; Calvo, 2017; Oseguera, 2012; García, 2012; Oroz, M. M., 2009).

### **3.3 Biosíntesis de nanopartículas de plata**

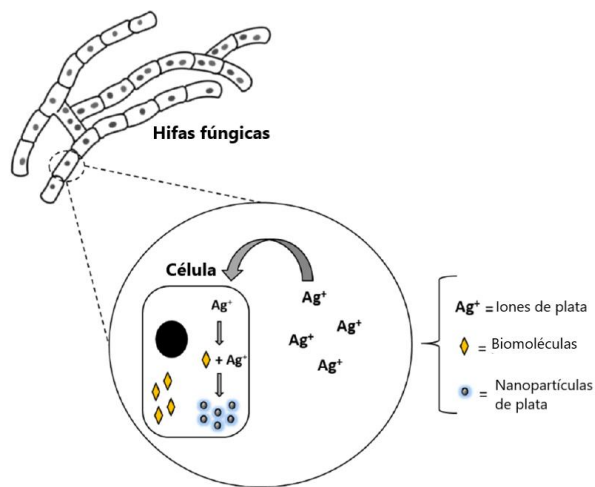
Debido a la importancia de las AgNPs se han empleado varios métodos para su síntesis. Se han fabricado mediante enfoques top-down (de arriba hacia abajo) y bottom-up (de abajo hacia arriba), entre los que se incluyen los métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos físicos con enfoque top-down, como evaporación-condensación y ablación láser, suelen ser de bajo rendimiento y muy costosos debido a la instrumentación utilizada y los altos consumos de energía. Por otra parte, los métodos químicos, que son con enfoque bottom-up, también pueden llegar a ser costosos por los reactivos químicos que se utilizan, además de que se realizan procedimientos poco amigables con el medio ambiente debido a los productos químicos tóxicos manipulados (Zanella, R., 2012). Mientras tanto, los métodos biológicos, que también se conocen como métodos de síntesis verde o de química verde, son de enfoque bottom-up, son económicos, sencillos y amigables con el medio ambiente (Ahmad, S., *et al.*, 2019).

Principalmente por la eliminación de reactivos químicos peligrosos y la utilización de compuestos biológicos en el proceso de síntesis, los métodos biológicos se han convertido en las rutas más convenientes para la fabricación de AgNPs enfocadas a aplicaciones biológicas. Estos métodos son relativamente sencillos, en los que se lleva a cabo la producción de nanopartículas a presión y temperatura casi normales. Al mismo tiempo, en ellos se puede llegar a tener un buen control sobre el crecimiento y estabilidad de las nanopartículas, gracias a las interacciones eléctricas con las moléculas del medio (Poulose, S., et al, 2014).

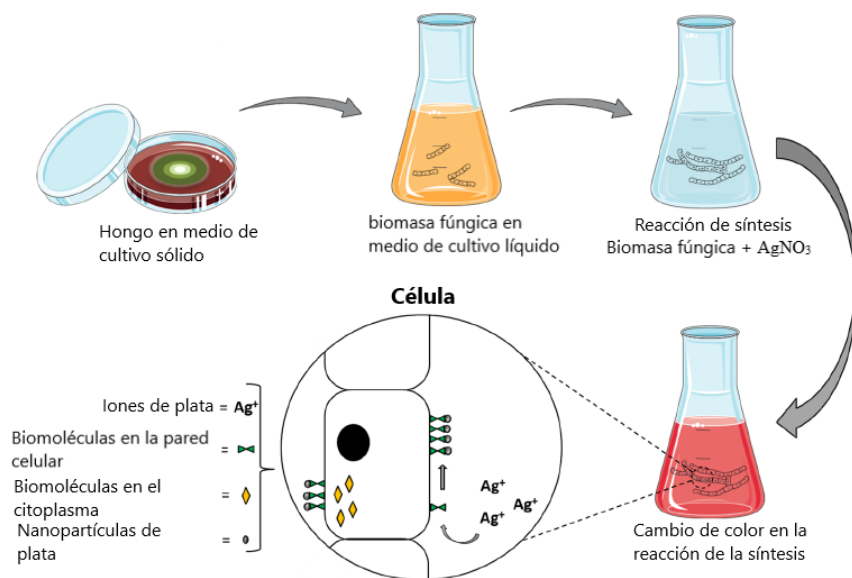
En la biosíntesis de AgNPs se han utilizado diferentes especies biológicas como bacterias, levaduras, hongos, plantas, algas, organismos fotosintéticos y organismos marinos con capacidades reductoras y estabilizantes (Dahoumane, et al., 2017). Los microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras, tiene la capacidad de reducir sales metálicas para formar nanopartículas metálicas con una distribución de tamaño estrecha, gracias a varias de sus enzimas reductasas. Con ellos se han producido AgNPs de forma intracelular y extracelular, utilizando biomasa bacteriana, sobrenadante y componentes derivados (Singh, P., *et al.*, 2016).

En la síntesis intracelular (ver figura 1), se pone en contacto la biomasa microbiana con los iones de plata, los cuales tienden a ingresar al interior de las células donde los microorganismos los reducen y se forman nanopartículas que suelen ser pequeñas y estables. Desafortunadamente, una desventaja de esta síntesis son los tratamientos post-síntesis requeridos para extraer las nanopartículas del interior de la célula. Por otra parte, la síntesis extracelular se realiza al poner en contacto los iones de plata con biomasa microbiana o con extractos de microorganismos. En el primer caso (ver figura 2), los iones de plata son reducidos por las proteínas presentes en la superficie externa de la pared celular de los microorganismos y ahí mismo se hospedan las nanopartículas. En este caso también se requieren técnicas de separación para aislar las nanopartículas. En la síntesis donde se usan extractos de microorganismos (ver figura 3), los iones de plata son reducidos por las biomoléculas presentes en los extractos y las nanopartículas se forman en un medio libre de componentes indeseables (Santos, T. S, *et al.*, 2021). Además, los genes resistentes a los metales, las proteínas, los péptidos, las enzimas, los cofactores reductores y los materiales orgánicos que actúan como agentes reductores, también ayudan a proporcionar un

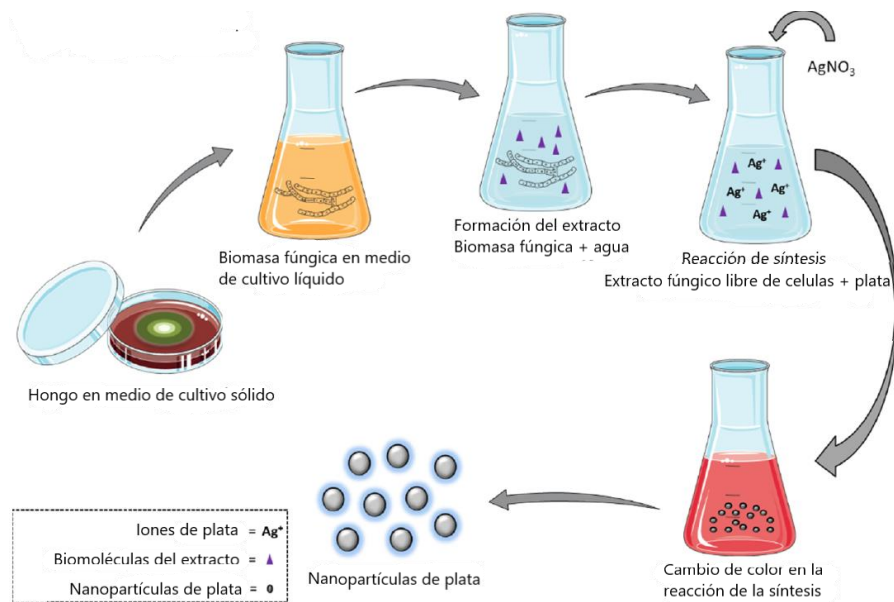
recubrimiento natural que evita la agregación de nanopartículas y favorece su estabilidad durante mucho tiempo (Singh, P., *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Biosíntesis intracelular de nanopartículas de plata mediada por hongos (Modificado a partir de Santos, T. S., *et al.*, 2021, p. 3).

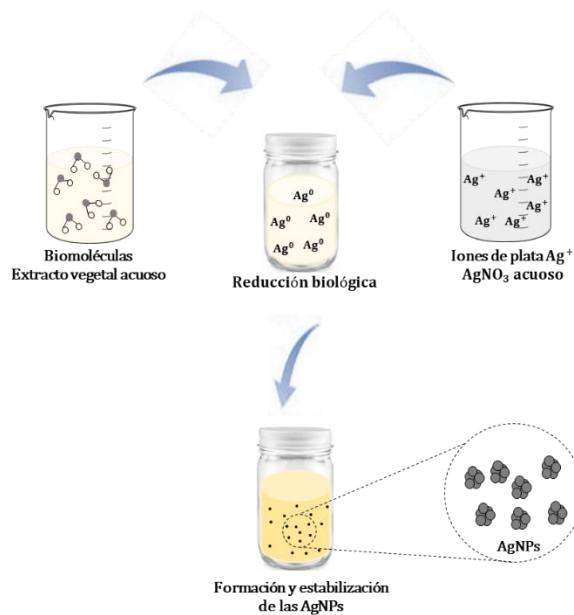


**Figura 2.** Biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata mediada por biomasa fúngica (Modificado a partir de Santos, T. S., *et al.*, 2021, p. 4).



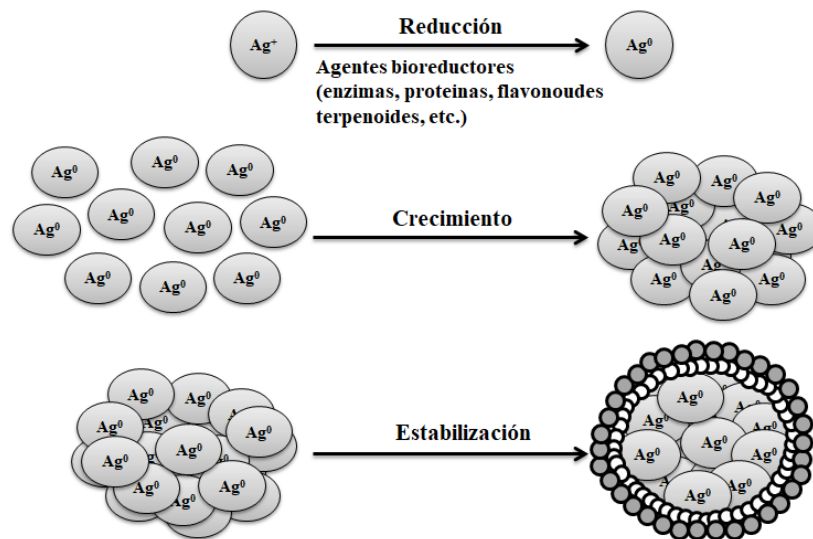
**Figura 3.** Biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata mediada por extracto fúngico libre de células (Modificado a partir de Santos, T. S, *et al.*, 2021, p. 4).

La biosíntesis de AgNPs efectuada en extractos acuosos de plantas es de los más utilizados por su simplicidad y efectividad en la producción de nanopartículas. Básicamente se lleva a cabo en tres etapas: la reducción de los iones  $\text{Ag}^+$  a  $\text{Ag}^0$ , la formación de las nanopartículas y su estabilización. El método consiste en diluir alguna sal de plata, como el nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), como agente precursor de los iones plata ( $\text{Ag}^+$ ) en un extracto natural de alguna planta, donde las moléculas biológicas se encargan de reducir los iones plata a estado neutro ( $\text{Ag}^0$ ). En seguida, los átomos de plata  $\text{Ag}^0$ , por enlaces metálicos, se comienzan a unir, primero, creando clústeres o núcleos metálicos y luego, por la unión con otros átomos libres de plata da lugar a la formación de las AgNPs (figura 4). Las biomoléculas del extracto de la planta a la vez evitan que las nanopartículas se aglomeren y sigan creciendo, lo que significa que las mantiene estables por largos periodos de tiempo (Oseguera, et al., 2020).



**Figura 4.** Biosíntesis de nanopartículas de plata mediada por extracto acuoso de plantas.

En la figura 5 se muestra el mecanismo de la biosíntesis de nanopartículas de plata expuesto por Mittal, *et al.* (2013). Entre los componentes biológicos presentes en los extractos de plantas que participan en la formación y estabilización de nanopartículas de plata se encuentran las proteínas, aminoácidos, vitaminas, polisacáridos, flavonoides, polifenoles, terpenoides, alcaloides, saponinas, fenoles, aceites esenciales y polioles (Ahmad, S., *et al.*, 2019; Singh, P., *et al.*, 2016).



**Figura 5.** Mecanismo de formación de las NPs. (Modificado a partir de Mittal, *et al.*, 2013, p. 348).

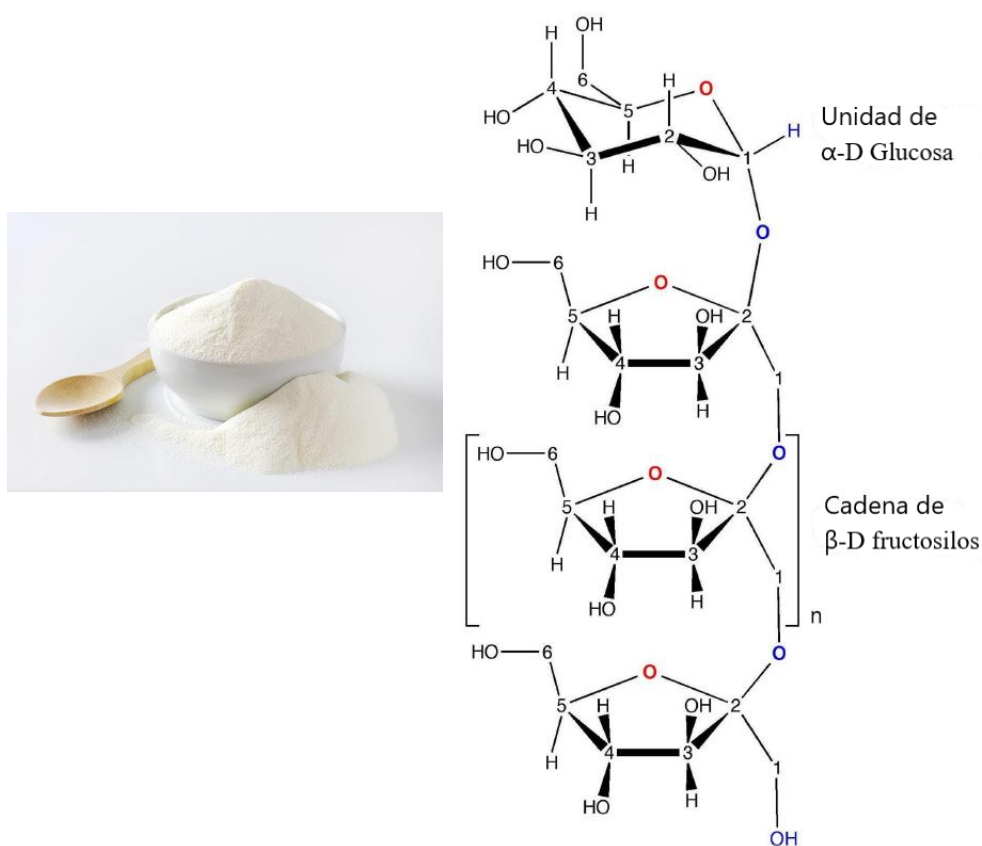


El primer trabajo reportado sobre la biosíntesis de AgNPs fue con la planta de alfalfa (Gardea, T. J. L., *et al.*, 2003). A partir de ahí, se ha realizado la síntesis de este nanomaterial con una gran variedad de extractos de plantas enteras y de partes de ellas como hojas, flores, frutos, tallos, raíces y semillas. Entre los extractos que han resultado efectivos para la formación de estas nanopartículas, por mencionar algunos en orden cronológico, se encuentran los de: sábila (*aloe vera*) (Chandran, S. P., *et al.*, 2006), hojas frescas de pimientos (*capsicum annuum*) (Li, S., *et al.*, 2007), hoja fresca de alcanfor (*cinnamomum camphora*) (Huang, J., *et al.*, 2007), hoja fresca de cilantro (*Coriandrum sativum*) (Sathyavathi, R., *et al.*, 2010), cáscara de naranja (*citrus sinensis*) (Kaviya, S., *et al.*, 2011), ajo (*Allium sativum*) (Rastogi y Arunachalam, 2011), jugo de limón (citrus limon) (Prathna, *et al.*, 2011), hoja de anona (*annona squamosa*) (Vivek, R., *et al.*, 2012), hoja seca de planta de te (*camellia sinensis*) (Loo, Y. Y., *et al.*, 2012), hojas de orégano (*Origanum vulgare*) (Sankar, R., *et al.*, 2013), azúcar blanca (Meshram, *et al.*, 2013), semilla de cereza española (*Mimusops elengi*) (Kumar, H. A. K., *et al.*, 2014), fruta congelada de saúco negro europeo (*Sambucus nigra*) (David, L., *et al.*, 2014), manzana (*Malus domestica*) (Ali, *et al.*, 2016), uva y tomate (*vitis vinifera y lycopersicon*) (Zia, *et al.*, 2016), hoja de eucalipto (*eucalyptus globulus*) (Balamurugan y Saravanan, 2017), chile habanero (*Capsicum chinense Jacq.*) (Oseguera, *et al.*, 2020), semillas de chía (*salvia hispánica L.*) (Sánchez, 2020) y té verde (Prema, *et al.*, 2022). Como se puede observar, la ventaja es que estos compuestos orgánicos están al alcance en México.

A pesar de que se pueden biosintetizar nanopartículas de plata a partir de extractos de una gran variedad de plantas, se ha encontrado que las características de las nanopartículas formadas difieren para cada extracto. Por ejemplo, puede variar la forma, el tamaño, la polidispersidad y la estabilidad de las nanopartículas. Tal variación se puede atribuir a que diferentes extractos de plantas contienen distintas concentraciones y combinaciones de agentes biológicos reductores (Mittal *et al.* 2013). Por este motivo, vale la pena estudiar el efecto del compuesto biológico en la síntesis.

La *inulina de agave*, que es la azúcar obtenida de la piña del agave, es un agente biológico que fue utilizado con éxito para las síntesis de AgNPs y reportado por primera vez en la tesis titulada “Estudio de condiciones físicas y químicas en la biosíntesis de nanopartículas de plata usando infusión de chía (*Salvia hispánica*) e *inulina de agave*”

(Sánchez, 2020). Este compuesto biológico es buen agente reductor, no tóxico, económico y de fácil acceso en la región de Jalisco, lugar donde abunda el agave (Justo, *et al.*, 2001). Se trata de un polisacárido constituido por una cadena de 2 a 60 moléculas de fructosa terminada en el extremo reductor con glucosa, es indigerible por los humanos y con alta solubilidad. Sus monosacáridos están unidos por enlaces glicosídicos  $\beta(2-1)$  terminados en el extremo reductor por un  $\alpha$ -D-(1-2)-glucopiranosido (ver figura 6) (Handa C, Goomer S, Siddhu A., 2012). Por sus ventajosas propiedades fisicoquímicas se utiliza en la industria alimentaria como fibra dietética soluble y agente sustituto de grasas o azúcares, y en la industria farmacéutica como estabilizador, excipiente y precursor en la síntesis de una amplia gama de compuestos. Más aún, posee propiedades anticancerígenas y potenciadoras del sistema inmunitario (Barclay, *et al.*, 2016). Por lo tanto, en este trabajo se estudia a la *inulina de agave* como agente reductor y estabilizador en la biosíntesis de las AgNPs.



**Figura 6.** Polímero de inulina (Modificado a partir de Barclay, *et al.*, 2016, p. 32).

### 3.4 Optimización de la bioproducción de nanopartículas de plata

Existe una amplia gama de compuestos biológicos extraídos de plantas que participan como agentes reductores y estabilizantes en la síntesis de AgNPs. No obstante, distintos agentes influyen en el tamaño y la concentración de las nanopartículas, características importantes en alguna aplicación específica. Por ejemplo, las AgNPs aumentan su actividad bactericida conforme disminuyen su tamaño, preferentemente si son de un diámetro entre 1 y 10 nm (Morones, *et al.*, 2005).

En cuanto a la concentración, en Parvekar, *et al.* (2020) se probó la eficacia antimicrobiana de distintas concentraciones de AgNPs (5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 mg/mL) de tamaño promedio de 5 nm contra la bacteria *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y encontraron un mejor resultado usando 0.625 mg/mL. En Ayala, *et al.* (2009) se indica que una concentración de 1.35 mg/mL de AgNPs de 10 nm es eficaz contra la bacteria *S. aureus*. Lu, *et al.* (2012) reportaron actividad antimicrobiana de AgNPs de 5, 15 y 55 nm contra cinco bacterias patógenas orales anaeróbicas (*Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) y bacterias aeróbicas *E. coli*, y encontraron que las de 5 nm de diámetro con concentración entre 25 y 50  $\mu\text{g/mL}$  poseían una mejor acción antibacteriana contra las bacterias anaeróbicas, mientras que para la cepa *E. coli* fueron más efectivas las de 5nm con concentración de 6  $\mu\text{g/mL}$ . Agnihotri, *et al.* (2014) indican que el efecto bactericida de las NPs depende de su tamaño y su dosis. Probaron NPs de tamaño promedio 5, 7, 10, 15, 20, 30, 50, 63, 85 y 100 nm contra cuatro cepas bacterianas (dos cepas de *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *S. aureus*), y encontraron que las AgNP con un tamaño inferior a 10 nm tuvieron notablemente mayor eficacia, siendo aún mejores las de 5 nm. También indicaron que el incremento bacteriano se redujo con la concentración de AgNPs.

Adicionalmente, en Hosnedlova, *et al.* (2022) reportaron la obtención de tres grupos de nanopartículas, AgNPs\_LI, AgNPs\_AS y AgNPs\_AM, mediante síntesis verde empleando tres extractos de plantas distintas *Lagerstroemia indica*, *Alstonia academicis* y *Aglaonema multifolium* respectivamente. En su mayoría, las nanopartículas obtenidas fueron esféricas con diámetro promedio de 12, 15 nm y 25 nm, respectivamente. Las de mejor efecto bactericida contra la *Staphylococcus aureus* fueron de concentraciones  $15\pm 5$ ,  $20\pm 5$ ,  $20\pm 5$

$\mu\text{g/mL}$  y contra la *Escherichia coli* fueron de  $20\pm 5$ ,  $15\pm 5$ ,  $15\pm 5$   $\mu\text{g/mL}$ . El mayor efecto inhibitorio y destructivo de la bacteria lo exhibieron las AgNPs preparadas con un extracto de *L. indica*, las cuales fueron las de menor tamaño. Por otra parte, Mortazavi, *et al.* (2021) a partir de extracto de corteza de *Elaeagnus angustifolia*, formaron AgNPs de tamaño de 65-90 nm, las cuales, con concentraciones de 1.5 a 20  $\mu\text{g/mL}$  mostraron efectividad antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*.

De acuerdo con Barabadi, *et al.* (2019) y Nayak, *et al.* (2011), las características deseadas en las AgNPs biosintetizadas con extractos vegetales pueden ser modificadas o controladas no solo variando el extracto vegetal, sino otros factores como la concentración del extracto, concentración del nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), temperatura, pH y tiempo de reacción. Por esta razón, resulta importante emplear metodologías rigurosas que permitan descubrir la influencia que los factores experimentales tienen en la biosíntesis de las AgNPs.

### **3.4.1 Método de Optimización Tradicional**

A la fecha, se ha estudiado el efecto que tienen algunos de los factores mencionados sobre ciertas características deseadas en la síntesis de AgNPs. Sin embargo, dichos estudios los han realizado principalmente por el método de optimización tradicional, conocido también como “método de una sola variable”, el cual consiste en variar uno de los factores mientras el resto se mantienen constantes. Se denomina método de optimización porque el objetivo es descubrir las condiciones experimentales que llevan a la formación de nanopartículas con las características deseadas o que mejor se aproximen a lo deseado (Bezerra, *et al.*, 2008).

Entre los trabajos que se han realizado para la optimización en la síntesis de AgNPs se encuentra el de Krishnaraj y colaboradores, quienes las biosintetizaron usando extracto de hoja de *Acalypha indica* y estudiaron, uno a la vez, los efectos del pH, tiempo de reacción, concentración de  $\text{AgNO}_3$  y relación de concentración de extracto y nitrato de plata, con el fin de optimizar el rendimiento, tamaño y estabilidad de las nanopartículas (Krishnaraj, *et al.*, 2012). Por otra parte, Alzahrani y Welham (2014) buscaron maximizar el rendimiento en la biosíntesis de AgNPs producidas con extracto de sandía, explorando de forma independiente el tiempo de contacto, la concentración de extracto, la concentración de solución de nitrato de plata, la proporción de reactivos y la temperatura de reacción. En su caso, Nayak, *et al.*

(2011) formaron AgNPs utilizando el hongo *Penicillium purpurogenum*, y estudiaron los efectos de la concentración del AgNO<sub>3</sub>, tiempo de incubación y pH en la formación de las NPs.

Aunque con el método tradicional se obtiene información importante sobre los efectos que cada factor experimental tiene en las nanopartículas sintetizadas, se presentan algunas desventajas. Este método no ofrece información completa sobre los efectos de las distintas interacciones entre los factores. Adicionalmente, al aumentar la cantidad de factores que se desean analizar, incrementa drásticamente la cantidad de experimentos a elaborar, lo cual significa que se requerirán mayores recursos y más tiempo.

Una nueva alternativa más reciente, eficiente y poco utilizada para la optimización en la fabricación de nanopartículas de plata es la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR). Con ella se puede obtener información completa de los efectos de cada factor y de todas las posibles interacciones de los factores. Además, en conjunto con diseños de experimentos adecuados, se pueden reducir al mínimo posible la cantidad de experimentos necesarios, disminuyendo el tiempo y recursos requeridos.

### **3.4.2 Metodología de Superficie de Respuesta**

La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para ajustar una relación funcional adecuada entre la respuesta de interés y un conjunto de factores, con la finalidad de conocer el comportamiento de la respuesta en función de los factores, y a partir de ello realizar predicciones sobre la respuesta (Khuri y Mukhopadhyay, 2010).

Recientemente se empezó a utilizar esta metodología para la optimización en la síntesis de AgNPs, obtenidas principalmente por métodos químicos (Chowdhury, *et al.*, 2016). Entre lo que se ha optimizado en la síntesis se encuentra el tamaño medio de AgNPs, el pico de mayor intensidad en la distribución de tamaños, la polidispersidad y el rendimiento del proceso (Qintero, *et al.*, 2019). Para el caso de AgNPs sintetizadas por métodos biológicos, por esta metodología se ha optimizado el diámetro promedio de AgNPs obtenidas con el hongo *Penicillium Citrinum* (Barabadi, *et al.*, 2019), el rendimiento de AgNPs

biosintetizadas con extracto de hoja de *Boswellia sacra* (Azmi, *et al.*, 2021) y el tamaño de AgNPs biosintetizadas con extracto de té verde (Prema, *et al.*, 2022).

Particularmente, en este trabajo optimizamos la producción de AgNPs tanto por la MSR, como con el método tradicional, para ello se miden las máximas absorbancias de cada muestra de NPs sintetizadas. De manera que se relaciona una mayor absorbancia con una mayor producción y concentración de AgNPs. Se explican más detalles en el capítulo de 4 de detalles experimentales.

La MSR fue desarrollada por G. E. P. Box y sus colegas en Imperial Chemical Industries en los años 50's. Inicialmente su enfoque fue para aplicación en la industria química. Sin embargo, se ha ido adaptando a diversas áreas como la agricultura, biotecnología (Gilmour, 2006) y actualmente en la nanotecnología. Esta metodología utiliza herramientas matemáticas y estadísticas con el fin de ajustar modelos empíricos a partir de datos experimentales obtenidos de un diseño de experimentos previamente planeado.

Básicamente se pretende expresar una variable o respuesta de interés,  $y$ , como función del conjunto de datos o factores experimentales,  $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$ . La respuesta de interés y los factores se deben relacionar de la siguiente manera:

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + \epsilon, \quad (1)$$

donde la forma de la función  $f$  generalmente es desconocida, pero se supone que es continua en  $(\xi_1, \xi_2, \xi_3, \dots, \xi_k)$ , y  $\epsilon$  representa un ruido o error observado en la respuesta. En el modelo es común transformar las variables  $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$ , conocidas como naturales que se expresan en las unidades naturales de medida, a variables codificadas  $x_1, x_2, \dots, x_k$  sin dimensiones, de manera que el valor:

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (2)$$

corresponde a una relación que gráficamente se puede representar mediante una hipersuperficie denominada superficie de respuesta. Como la función  $f$  en general es desconocida, el primer paso de la metodología es encontrar la  $f$  más adecuada. Generalmente se inicia con un polinomio de orden bajo en alguna región de las variables independientes. El modelo más simple es un polinomio de primer grado cuya expresión algebraica es la ecuación 3.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \epsilon = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \epsilon. \quad (3)$$

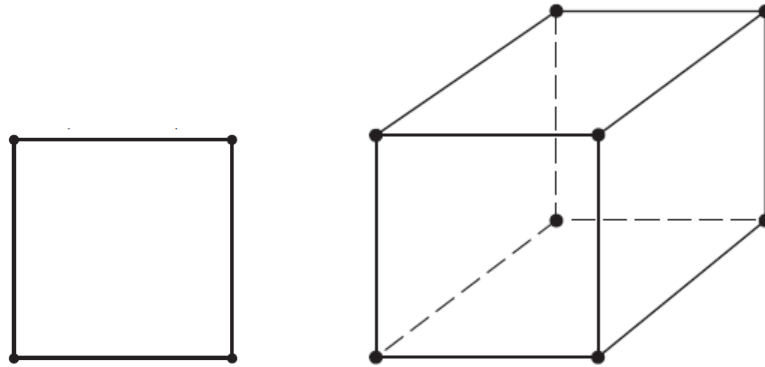
Para el caso cuando el modelo presenta una curvatura, lo conveniente es expresarlo con un polinomio de orden mayor, el más común es un modelo de segundo orden, el cual se expresa de forma general como en la ecuación 4. Este modelo es el más apropiado cuando se requiere encontrar los valores óptimos para la variable de respuesta. En este caso, los términos de la última sumatoria corresponden a las interacciones de los factores  $x_i$  y  $x_j$ .

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i < j=2}^k \sum \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon. \quad (4)$$

Para el ajuste del modelo, mediante el método de mínimos cuadrados se estiman los parámetros  $\beta_j$ , para ello se asume que el término de error  $\epsilon$  en el modelo tiene  $E(\epsilon) = 0$ ,  $V(\epsilon) = \sigma^2$  y que las  $\epsilon_i$  son variables aleatorias no correlacionadas. Además, para una estimación efectiva de los parámetros  $\beta_j$  se requieren pruebas experimentales adecuadas. Esto significa que los diseños de experimentos empleados para recopilar los datos experimentales juegan un rol muy importante. Entre las características deseables de los diseños de experimentos se encuentran: proporciona una distribución razonable de puntos de datos a lo largo de la región de interés, permite investigar la adecuación del modelo, incluida la falta de ajuste, permite realizar experimentos en bloques, permite construir secuencialmente diseños de orden superior, proporciona una estimación interna del error, proporciona estimaciones precisas de los coeficientes del modelo, proporciona un buen perfil de la varianza de predicción a lo largo de la región del experimento, proporciona una solidez razonable frente a valores atípicos o faltantes, no requiere una gran cantidad de corridas, no requiere demasiados niveles de las variables independientes y garantiza la simplicidad de cálculo de los parámetros del modelo (Myers & Anderson, 2016).

Para el caso cuando se requiere ajustar un modelo de primer orden, los únicos diseños que minimizan la varianza de los coeficientes de regresión del modelo ajustado son los diseños ortogonales de primer orden, entre los que se encuentran el diseño factorial  $2^k$  ( $k$  representa el número de factores experimentales) y el simplex. En el diseño factorial  $2^k$  cada uno de los factores cuenta con dos niveles, en la figura 7 se muestran dos diseños factoriales

$2^k$  para  $k = 2$  y  $k = 3$ . Cada punto de la figura representa un experimento, así que para  $k = 2$  se requieren 4 experimentos, para  $k = 3$  se requieren 8 y así sucesivamente.



**Figura 7.** Diseño factorial  $2^k$  para  $k=2$  y  $k=3$  factores.

Para el ajuste de modelos de segundo orden resultan convenientes los diseños ortogonales y giratorios, esto último quiere decir, aquellos en los que la varianza de la respuesta predicha por el modelo es constante en todos los puntos que son equidistantes del centro de diseño. Entre los más utilizados se encuentran el diseño central compuesto (DCC) y el diseño Box-Benhken (DBB).

## Diseños experimentales para ajustar modelos de segundo orden

### Diseño Central Compuesto (DCC)

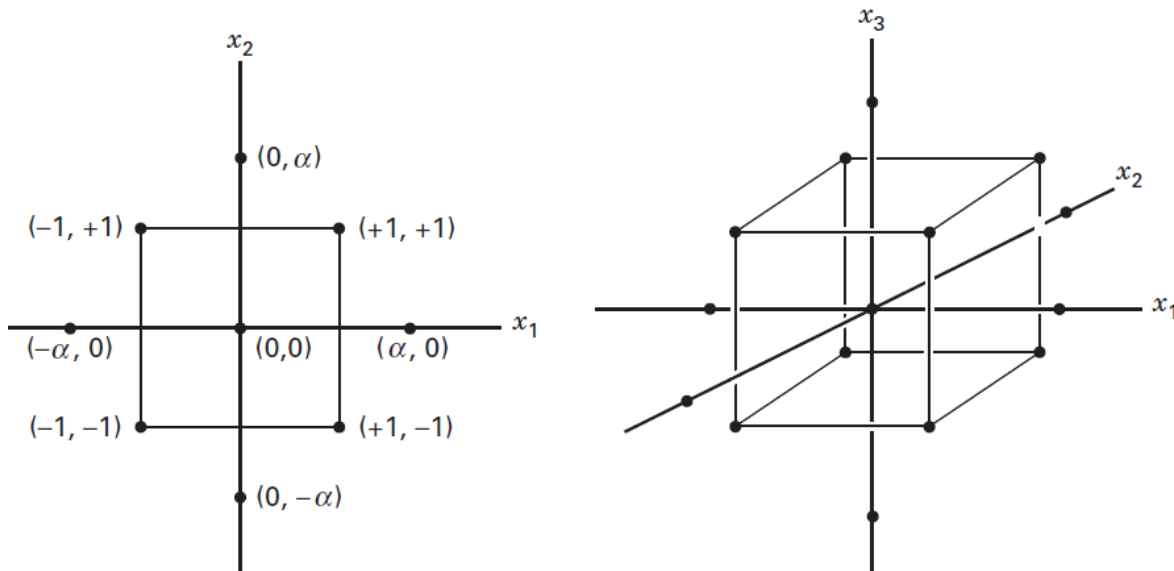
El DCC es el más popular para ajustar modelos de segundo orden. Consta de un diseño factorial completo  $2^k$  (o una fracción de él), una porción axial que se constituye de  $2k$  puntos dispuestos de manera que se elijan dos puntos en el eje de cada factor a una distancia  $\alpha$  desde el centro de diseño y  $n_c$  puntos centrales replicados. En total se conforma por  $N = 2^k + 2k + n_c$  puntos experimentales, donde  $k$  representa el número de factores. La distancia  $\alpha$  de los puntos axiales al centro del diseño depende del número de factores y se pueden calcular mediante la fórmula  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ , de manera que, para dos, tres y cuatro factores los valores de  $\alpha$  son 1.41, 1.68 y 2.00, respectivamente. En este diseño cada factor cuenta con cinco niveles  $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$ , que en el orden en que están escritos de



izquierda a derecha representan: el punto axial mínimo, punto factorial mínimo, punto central, punto factorial máximo y punto axial máximo.

Los valores de  $\alpha$  y la cantidad de réplicas de puntos centrales juegan un rol importante en el diseño ya que estos pueden favorecer que sea ortogonal y giratorio, siendo propiedades deseadas para ajustar modelos de segundo orden. La definición de los parámetros axiales como  $\alpha = (2^k)^{1/4}$  asegura que el diseño sea giratorio y mediante una cantidad adecuada de replicas centrales se puede lograr la propiedad de ortogonalidad.

En la figura 8 aparece el diseño central compuesto para  $k = 2$  con  $(x_1, x_2)$  y  $k = 3$  con  $(x_1, x_2, x_3)$  factores, los cuales aparecen codificados, es decir, el nivel más bajo de cada factor se representa con -1 y el más alto con +1. Los puntos centrales se ubican en el centro del sistema cartesiano y los puntos axiales, correspondientes a los  $\alpha$  se ubican sobre los ejes de cada factor, pero fuera del cuadrado y del cubo respectivamente.

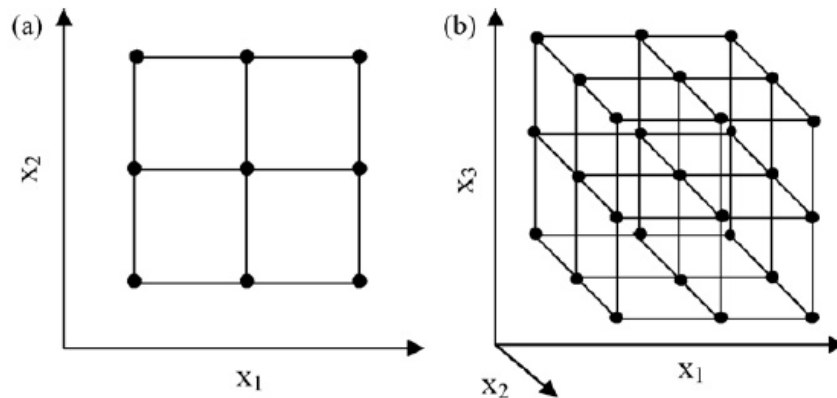


**Figura 8.** Diseño central compuesto para  $k=2$  y  $k=3$  factores codificados (Myers & Anderson, 2016. p. 502).

### Diseño factorial $3^k$

El diseño factorial  $3^k$  es similar al diseño  $2^k$  con la diferencia de que en este nuevo diseño cada uno de los factores  $k$ , cuenta con tres niveles (en la figura 9 se representan geoméricamente los diseños factoriales  $3^k$  para dos y tres factores), lo que implica una mayor cantidad de puntos experimentales, que incluso se incrementa rápidamente para

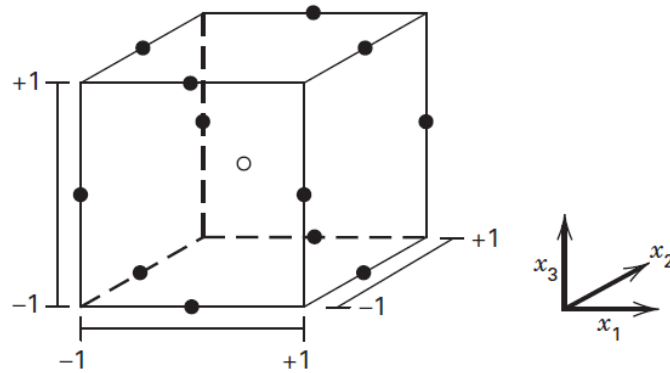
valores más grandes de  $k$ , pues el número de experimentos está dado por  $N = 3^k$ . Para cuando se tienen dos factores únicamente, este diseño puede ser útil para ajustar modelos de segundo orden. Sin embargo, si el número de factores es mayor a dos, la cantidad de experimentos aumenta drásticamente lo cual lo hace un diseño inadecuado en la MSR.



**Figura 9.** Diseño factorial  $3^k$  para  $k=2$  y  $k=3$  factores (Bezerra, *et al.*, 2008, p. 970).

### **Diseño Box-Behnken (DBB)**

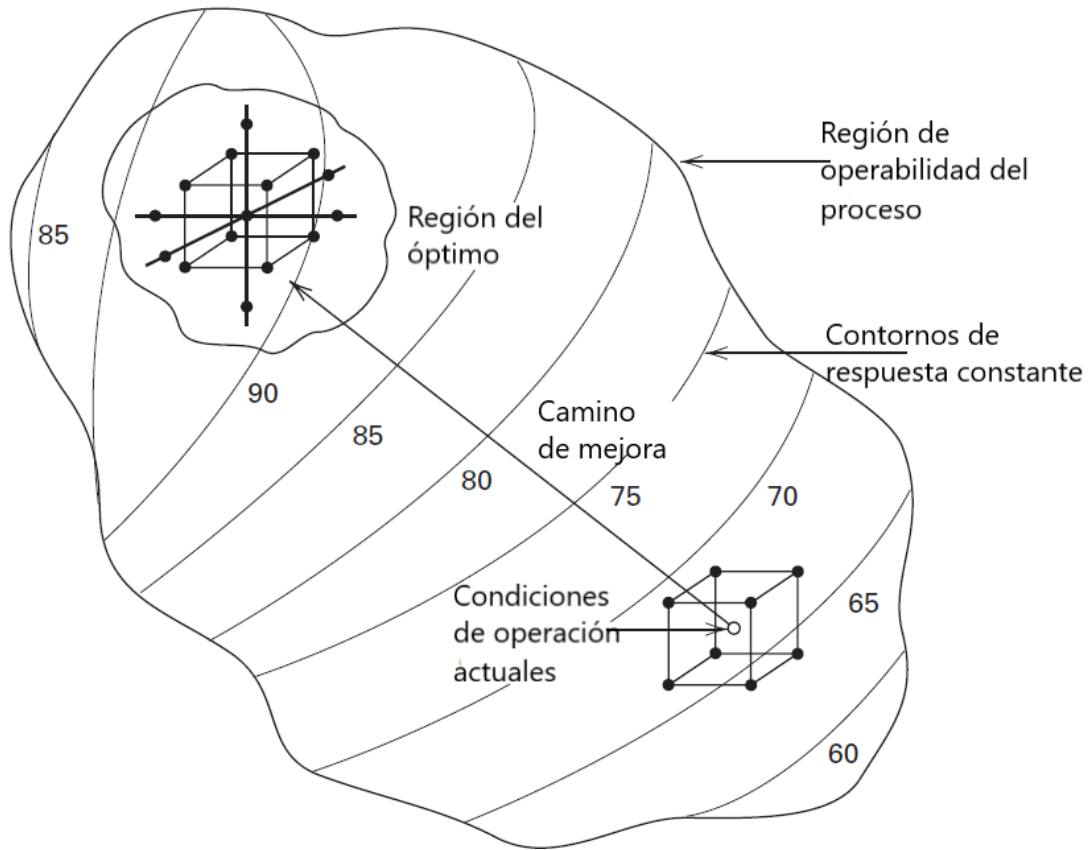
El diseño Box y Behnken consiste en una reducción del diseño factorial  $3^k$ , la cual se hace sin perder eficiencia para el ajuste de modelos de segundo orden. En este diseño, los puntos experimentales se encuentran ubicados en una hiperesfera equidistante del punto central. El número total de experimentos requeridos está dado por  $N = 2k(k - 1) + n_c$ , donde  $k$  representa el número de factores y  $n_c$  la cantidad de réplicas del punto central. Todos los factores codificados poseen tres niveles; -1, 0 y +1. En la figura 10 se muestra este diseño con tres factores el cual incluye 13 puntos experimentales donde se considera únicamente un punto central.



**Figura 10.** Diseño Box-Behnken para tres factores codificados (Myers & Anderson, 2016, p. 504).

### **Determinación de condiciones óptimas**

Para encontrar un óptimo mediante la MSR se lleva a cabo un procedimiento secuencial. Generalmente se inicia en una región de la superficie de respuesta que está lejos del óptimo y se realiza lo necesario para llegar a través del camino más rápido y eficiente a una vecindad muy próxima del valor buscado. En regiones distantes del valor óptimo, la superficie es plana y se modela convenientemente con un polinomio de primer orden. En este caso se sigue el método de ascenso (o descenso) más empinado para llegar a una vecindad del óptimo (puede ser máximo o mínimo), en donde se deberá ajustar un modelo de segundo orden. En la figura 11 se muestra un esquema de la naturaleza secuencial de la MSR.



**Figura 11.** Naturaleza secuencial de la MSR (Myers & Anderson, 2016. p. 480).

Una vez que se ha llegado a una región cercana del óptimo y se ha ajustado un modelo de segundo orden adecuado para la superficie de respuesta, se procede a localizar los valores de los factores  $x_1, x_2, \dots, x_k$  que optimizan la respuesta. Para ello, primero se buscan los puntos estacionarios, los cuales resultaran al resolver el conjunto de derivadas parciales igualadas a cero:

$$\frac{\partial \hat{y}}{\partial x_1} = \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_2} = \dots = \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_k} = 0. \quad (5)$$

Esos puntos estacionarios se pueden encontrar mediante la ecuación de la forma matricial:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \mathbf{x}'\mathbf{b} + \mathbf{x}'\mathbf{B}\mathbf{x}, \quad (6)$$

donde

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_k \end{bmatrix}; \quad \mathbf{b} = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_1 \\ \hat{\beta}_2 \\ \vdots \\ \hat{\beta}_k \end{bmatrix}; \quad \mathbf{B} = \begin{bmatrix} \hat{\beta}_{11} & \hat{\beta}_{12}/2 & \cdots & \hat{\beta}_{1k}/2 \\ \hat{\beta}_{12}/2 & \hat{\beta}_{22} & \cdots & \hat{\beta}_{2k}/2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \hat{\beta}_{1k}/2 & \hat{\beta}_{2k}/2 & \cdots & \hat{\beta}_{kk} \end{bmatrix}, \quad (7)$$

donde  $\mathbf{x}$  es el vector de los factores,  $\mathbf{b}$  el vector de los coeficientes de regresión de primer grado y  $\mathbf{B}$  la matriz simétrica cuyos elementos en la diagonal son los coeficientes cuadráticos puros ( $\hat{\beta}_{ii}$ ), y los de fuera de la diagonal corresponden a  $1/2$  de los coeficientes cuadráticos mixtos ( $\hat{\beta}_{ij}, i \neq j$ ). La derivada de  $\hat{y}$  con respecto a los elementos del vector  $\mathbf{x}$  igualada a cero es:

$$\frac{d\hat{y}}{d\mathbf{x}} = \mathbf{b} + 2\mathbf{B}\mathbf{x} = \mathbf{0}, \quad (8)$$

y al resolverse se encuentra que el punto estacionario está dado por:

$$\mathbf{x}_s = -\frac{1}{2}\mathbf{B}^{-1}\mathbf{b}. \quad (9)$$

Por lo tanto, el valor de la respuesta en dicho punto estacionario corresponde a:

$$\hat{y}_s = \hat{\beta}_0 + \frac{1}{2}\mathbf{x}'_s\mathbf{b}. \quad (10)$$

Luego, para identificar si ese punto estacionario da lugar a una respuesta máxima, una respuesta mínima o un punto de silla se calculan los autovalores de la matriz  $\mathbf{B}$  mediante la ecuación:

$$|\mathbf{B} - \lambda_i| = 0, \quad i = 1, 2, \dots, k. \quad (11)$$

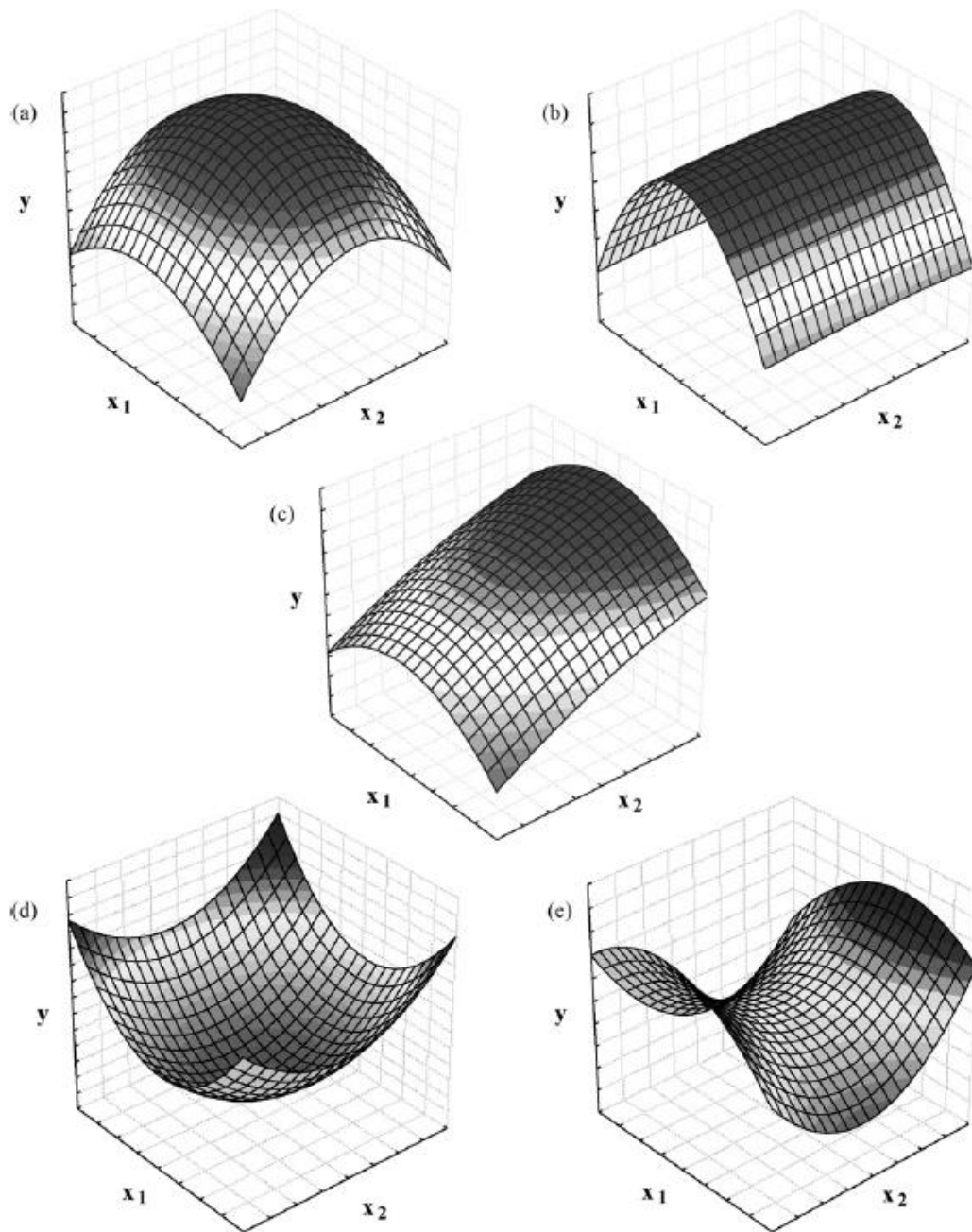
Si todos los  $\lambda_i$  son positivos, se trata de un punto de mínima respuesta, si todos los  $\lambda_i$  son negativos, se trata de un punto de máxima respuesta y si los  $\lambda_i$  son positivos y negativos se trata de un punto de silla.

En resumen, el procedimiento que se sigue en la MSR para obtener valores óptimos es el siguiente (Bezerra, *et al.*, 2008):

1. Selección de los factores experimentales con mayor efecto en la respuesta de interés y delimitación de la región experimental, es decir, delimitación del rango de valores para cada factor.

2. Selección y realización de un diseño de experimentos adecuado al sistema. Considerar si se trata de un diseño para un modelo de primer o de segundo orden. Existen diversos programas estadísticos, tales como Minitab o Design-Expert 7 (que es el utilizado en este trabajo) que ayudan a efectuar de una manera rápida y sencilla el diseño de experimentos, el cual propone la cantidad de experimentos a realizar y los valores de cada uno de los factores de estudio que se deben tomar en cuenta en cada experimento.
3. Realización de los experimentos indicados por el diseño seleccionado y obtención de los valores de la respuesta para cada uno de los experimentos.
4. Tratamiento matemático-estadístico de los datos experimentales obtenidos para la realización del ajuste del modelo polinomial. En general, el software estadístico tiene la capacidad de realizar las operaciones matemáticas y estadísticas para la realización del ajuste del modelo mediante análisis de varianza y pruebas de hipótesis.
5. Evaluación del modelo ajustado mediante el análisis estadístico de los datos. Se debe analizar el ajuste en comparación con los valores reales experimentales y determinan si es adecuado o no, considerando los errores o residuales. Un modelo estará bien ajustado a los datos experimentales si presenta una regresión significativa y una falta de ajuste no significativa. Además, si el modelo matemático está bien ajustado, su gráfica de residuos presentará un comportamiento que sugiere una distribución normal.
6. Verificación de la necesidad y posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región óptima. En caso de estar alejado del óptimo, será necesario cambiar la región experimental, hacer un nuevo diseño de experimentos y un nuevo ajuste polinomial. Las superficies generadas por los modelos lineales, que se dan cuando se está alejado del óptimo, se pueden utilizar para indicar la dirección en la que se debe desplazar el diseño original para alcanzar las condiciones óptimas.
7. Obtención del valor óptimo para la variable de respuesta. También, geoméricamente se podría identificar el óptimo visualizando la superficie de respuesta, la cual se puede apreciar únicamente en una gráfica bidimensional o tridimensional. Así que, si hay tres o más variables o factores experimentales, la visualización del gráfico en tercera dimensión solo será posible fijando como constantes una o más variables, de manera que la respuesta se ubique en un eje y dos de los factores no constantes en los otros dos ejes cartesianos. Un punto cúspide dará un máximo y un punto de valle un mínimo. Por ejemplo, en la

figura 12 se muestran gráficos de superficie de respuesta cuadráticas o de segundo orden donde se trata de encontrar los valores óptimos para los factores  $x_1$  y  $x_2$ . En la figura 12(a) y 12(b) las superficies contienen el punto máximo dentro de la región experimental. Para el caso de la superficie 12(b) se presenta una meseta con respecto a la variable  $x_2$ , lo que significa que la variación en los niveles de este factor no afecta el sistema estudiado. En la superficie de la figura 12(c) no se alcanza a apreciar el punto máximo ya que está fuera de la región experimental. Para este caso es necesario realizar un desplazamiento, si es posible, de la región experimental. En la superficie de la figura 12(d) aparece un punto mínimo dentro de la región experimental. Por último, en la figura 12(e) aparece un punto de silla como punto crítico. Sin embargo, como se busca una respuesta máxima o mínima este punto no sirve como valor óptimo.



**Figura 12.** Superficies de respuesta cuadráticas para dos factores  $x_1$  y  $x_2$ . (a) máximo, (b) meseta, (c) máximo fuera de la región experimental, (d) mínimo y (e) punto de silla. (Bezerra, *et al.*, 2008. p. 969).



## CAPÍTULO 4

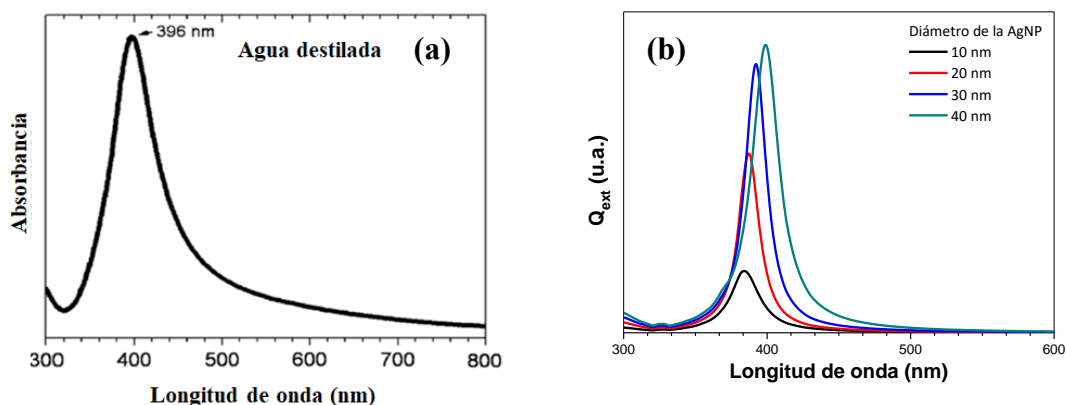
### DETALLES EXPERIMENTALES

#### 4.1 Optimización por Método Tradicional

Mediante el método tradicional se estudió el efecto que tienen algunos factores experimentales en la formación de AgNPs. Además, se analizaron las condiciones que favorecen una mayor tasa de formación de AgNPs en el menor tiempo posible y con el mínimo de recursos. Los factores experimentales estudiados fueron: concentración de *inulina de agave*, concentración de sal de  $\text{AgNO}_3$ , temperatura y pH de la solución.

El monitoreo de la tasa de formación de NPs se hizo midiendo su absorbancia en el ultravioleta visible con un espectrofotómetro UV-Vis. Esto es porque las AgNPs presentan una absorbancia intensa centrada en alrededor de 400 nm (Oseguera, et al., 2018). Esta característica óptica es conocida como Resonancia de Plasmón Superficial (RPS), la cual ocurre cuando la frecuencia de oscilación colectiva de electrones de conducción de la nanopartícula es igual a la frecuencia de la radiación electromagnética alrededor de 400 nm. De manera que, en torno a esa longitud de onda ocurre una máxima absorción de luz que se puede verificar en el espectro de absorción UV-Vis como un pico.

En la figura 13a se presenta un pico de absorbancia característico de AgNPs. Su perfil y posición puede variar en función del tamaño, distribución de tamaños, forma y aglomeración de las nanopartículas (García, 2011). En la figura 13b aparecen los distintos perfiles que toma el pico de absorbancia teórica cuando el tamaño de una nanopartícula de plata cambia. Estos picos de absorbancia teórica fueron obtenidos a partir de la teoría de Mie debido a que permite estimar la eficiencia de absorción de partículas metálicas esféricas, la cual se puede asociar con la absorbancia experimental (Sánchez, 2020).



**Figura 13.** Espectros de absorción UV-Vis de AgNPs (a) suspendidas en agua destilada (Modificado a partir de Oseguera, *et al.*, 2018), (b) de diferentes tamaños (Sánchez, 2020, p. 29).

Otro factor que puede influir en el perfil del pico de absorbancia, específicamente en su intensidad, es la concentración de nanopartículas. Por este motivo, en este trabajo se considera la relación lineal de Lambert-Beer:

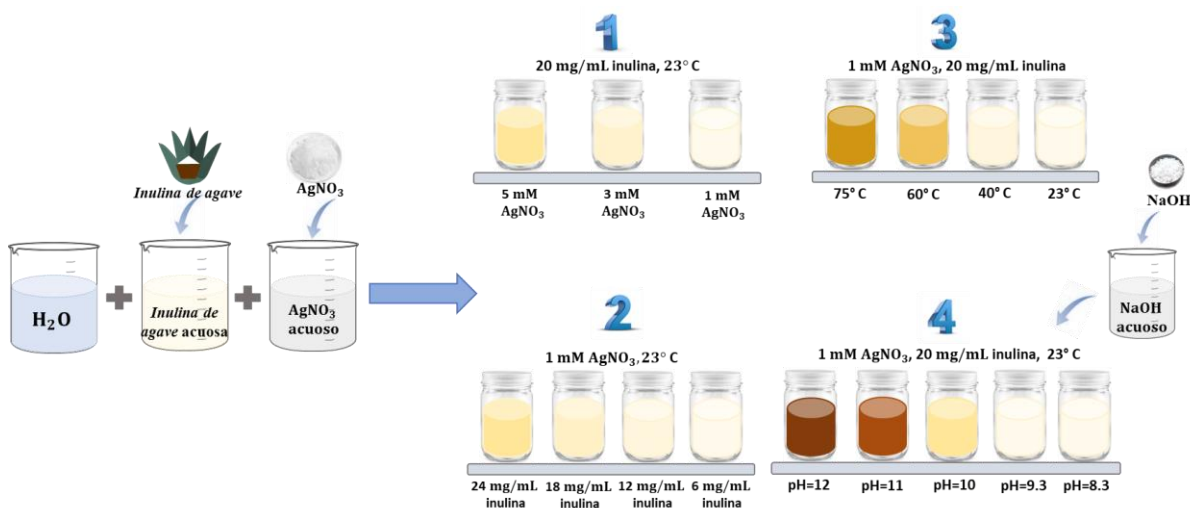
$$A = \alpha \cdot l \cdot C \quad (12)$$

donde  $A$  es la absorbancia,  $\alpha$  es el coeficiente de absorción,  $l$  es la longitud del camino de radiación a través de la muestra y  $C$  es la concentración de nanopartículas suspendidas del absorbente. Esta ecuación indica que una mayor concentración de nanopartículas en suspensión corresponde a un mayor pico de absorbancia, es decir, el aumento en el pico de absorbancia significa que la formación de nanopartículas se incrementa. Cabe destacar que esta interpretación es útil si la absorbancia de la muestra de estudio presenta poca o nula variación en la posición del pico de absorción, ya que de presentar desplazamiento con la longitud de onda podría interpretarse como un cambio en la distribución de tamaño de las nanopartículas (Oseguera, *et al.*, 2014).

Para explorar el efecto de los factores se preparó una variedad de experimentos utilizando *inulina de agave* en polvo adquirida por la empresa EDULAG ubicada en Villa Corona, Jalisco. La sal de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y el hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) se compraron en la compañía Sigma Aldrich. Todas las muestras fueron preparadas en un volumen total de 50 mL, en solución acuosa usando agua destilada, a temperatura ambiente (aproximadamente  $23^\circ\text{C}$ ), excepto cuando se exploró su efecto. Las muestras se mantuvieron

en completo reposo y se cubrieron con papel de aluminio. Además, todas se realizaron por duplicado para asegurar su reproducibilidad.

En la figura 14 se presenta el esquema de los cuatro experimentos realizados mediante el método de optimización tradicional. En el experimento 1 se varió la concentración de *inulina de agave* (24, 18, 12 y 6 mg/mL); en el 2, la concentración de  $\text{AgNO}_3$  (5, 3 y 1 mM); en el 3, la temperatura (75, 60, 40 y 23 °C); y en el 4, el pH (12, 11, 10, 9,3 y 8,3). En el experimento 3, para ajustar la temperatura, se colocó solución de *inulina de agave* en una placa caliente con agitación magnética, y cuando la solución alcanzó la temperatura deseada, se agregó la solución de  $\text{AgNO}_3$  para llevar a cabo la síntesis. La muestra se mantuvo a la temperatura considerada durante 1 hora y luego se retiró de la placa de agitación magnética y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En el experimento 4, para ajustar el pH, se preparó una concentración molar de 0.1 M de hidróxido de sodio (NaOH), la cual fue goteada meticulosamente en la solución de *inulina de agave* en continua agitación hasta alcanzar el valor de pH deseado, posteriormente se vertió la solución de  $\text{AgNO}_3$  para llevar a cabo la síntesis. Para medir tanto el pH como la temperatura se utilizó un pH-metro digital.



**Figura 14.** Conjunto de muestras para la síntesis de AgNPs variando 1) *inulina de agave*; 2)  $\text{AgNO}_3$ ; 3) temperatura y 4) pH.

#### 4.1.1 Efecto de la *inulina de agave* en la síntesis

Se prepararon cuatro muestras (S1A, S2A, S3A y S4A) con diferente concentración de *inulina de agave* y misma concentración de  $\text{AgNO}_3$ , mismo valor de temperatura y pH. La

tabla 1 muestra los parámetros de síntesis y sus correspondientes valores utilizados. Estas muestras fueron analizadas mediante espectroscopía UV-Vis 23 días después de la preparación.

**Tabla 1.** Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar el efecto de la *inulina de agave* en la síntesis de AgNPs.

Muestra	<i>Inulina de agave</i> (mg/mL)	AgNO <sub>3</sub> (mM)	Temperatura (°C)	pH
S1A	6	1	23	6.5
S2A	12	1	23	6.5
S3A	18	1	23	6.5
S4A	24	1	23	6.5

#### 4.1.2 Efecto del AgNO<sub>3</sub> en la síntesis

Se prepararon tres muestras (S1B, S2B y S3B) con diferentes concentraciones de AgNO<sub>3</sub> y la misma concentración de *inulina de agave*, mismo valor de temperatura y pH. La tabla 2 muestra los parámetros y sus correspondientes valores utilizados en la síntesis. Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopía UV-Vis 22 días después de la preparación.

**Tabla 2.** Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar el efecto del AgNO<sub>3</sub> en la síntesis de nanopartículas de plata.

Muestra	<i>Inulina de agave</i> (mg/mL)	AgNO <sub>3</sub> (mM)	Temperatura (°C)	pH
S1B	20	1	23	6.5
S2B	20	3	23	6.5
S3B	20	5	23	6.5

#### 4.1.3 Efecto de la temperatura en la síntesis

Se prepararon cuatro muestras (S1C, S2C, S3C y S4C) con diferentes valores de temperatura y la misma concentración de *inulina de agave*, concentración de AgNO<sub>3</sub> y pH. La tabla 3 muestra los parámetros y sus correspondientes valores utilizados en la síntesis. Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopía UV-Vis 11 días después de la preparación. Además, la muestra obtenida con una temperatura de 75°C fue analizada por MET.

**Tabla 3.** Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para analizar el efecto de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de plata.

Muestra	<i>Inulina de agave</i> (mg/mL)	AgNO <sub>3</sub> (mM)	Temperatura (°C)	pH
S1C	20	1	23	6.5
S2C	20	1	40	6.5
S3C	20	1	60	6.5
S4C	20	1	75	6.5

#### 4.1.4 Efecto del pH en la síntesis

Se prepararon cinco muestras (S1D, S2D, S3D, S4D y S5D) con diferentes valores de pH y misma concentración de *inulina de agave*, concentración de AgNO<sub>3</sub> y temperatura. La tabla 4 muestra los parámetros y sus correspondientes valores utilizados en la síntesis. Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopía UV-Vis 40 minutos después de la preparación. Las muestras S3D (pH=10) y S2D (pH=11) se caracterizaron por MET.

**Tabla 4.** Parámetros y valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar el efecto del pH en la síntesis de nanopartículas de plata.

Muestra	<i>Inulina de agave</i> (mg/mL)	AgNO <sub>3</sub> (mM)	Temperatura (°C)	pH
S1D	20	1	23	12
S2D	20	1	23	11
S3D	20	1	23	10
S4D	20	1	23	9.3
S5D	20	1	23	8.3

## 4.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata

Se estudió el efecto bactericida de dos muestras de nanopartículas de plata en una cepa de la bacteria *E. coli*. La bacteria fue extraída del río Ameca en Jalisco, México, y se caracterizó por PCR en un cultivo bacteriano en agar cromogénico (CHROMOgar) para confirmar su presencia por amplificación del gen *malB*.

Posteriormente, la bacteria se expuso a dos concentraciones diferentes de AgNPs etiquetadas como S1<sub>bac</sub> y S2<sub>bac</sub>. La muestra S1<sub>bac</sub> tenía una concentración de 10 mM de AgNO<sub>3</sub> en disolución con una concentración de *inulina de agave* de 60 mg/mL. La muestra S2<sub>bac</sub> se preparó con una concentración de 1 mM de AgNO<sub>3</sub> en disolución con 20 mg/mL de concentración de *inulina de agave*. En las dos muestras se ajustó un pH de 12, en la tabla 5 se presenta el contenido en cada una.

**Tabla 5.** Valores utilizados en la preparación de las muestras para estudiar efecto bactericida.

Muestra	<i>Inulina de agave</i> (mg/mL)	AgNO <sub>3</sub> (mM)	Temperatura (°C)	pH
S1 <sub>bac</sub>	60	10	23	12
S2 <sub>bac</sub>	20	1	23	12

Para determinar la actividad antibacteriana de las nanopartículas se empleó el método de microdilución (Bhowmik, S., *et al.*, 2018). En la tabla 6 se presenta el contenido utilizado en cada uno de los tubos de ensayo. En los seis tubos se vertieron 5 mL de caldo de cultivo Luria Bertani (LB). En los tubos 2 al 6 se vertió 100 µL del cultivo bacteriano con una concentración de 10<sup>8</sup> CFU/mL. En el tubo 3 se agregaron 100 µL de la solución de *inulina de agave* de 60 mg/mL y en el tubo 6, 100 µL de la solución de *inulina de agave* de 20 mg/mL, esto para verificar la ausencia del efecto antibacteriano por parte de la *inulina de agave*. Finalmente, en lugar de la solución de *inulina de agave*, a los tubos 4 y 5 se añadió 100 µL de AgNPs correspondiente a la muestra S1<sub>bac</sub> y S2<sub>bac</sub>, respectivamente. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 h y el efecto antibacteriano se detectó a simple vista.

**Tabla 6.** Contenido de los tubos de ensayo para estudiar la actividad antibacteriana.

Tubo	LB (mL)	<i>E. coli</i> (µL)	<i>Inulina</i> (µL)	Muestra de AgNPs (µL)
1	5	-	-	-
2	5	100	-	-
3	5	100	100 (60 mg/mL)	-
4	5	100	-	S1 <sub>bac</sub> (100)
5	5	100	-	S2 <sub>bac</sub> (100)
6	5	100	100 (20 mg/mL)	-

### 4.3 Optimización por Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

De acuerdo con los pasos de la MSR expuestos por Bezerra, *et al.* (2008), se inició estableciendo la variable de respuesta y los factores experimentales que tienen efecto sobre ella. Con la información obtenida previamente de la optimización por el método tradicional se optó por elegir nuevamente los mismos factores experimentales, pero cada uno con distintos valores o niveles. Se encontró que al aumentar el valor del pH se eleva notablemente la tasa de formación de AgNPs. Así que, para evitar que la intensidad máxima del pico de absorción sobrepase el rango de medida del espectrofotómetro y poder monitorear las máximas absorbancias, se eligieron niveles más bajos tanto de la *inulina de agave* como del AgNO<sub>3</sub> a la vez que se incrementaron los niveles de pH. Además, con los nuevos valores de

los factores se buscó aprovechar en mayor medida las moléculas reductoras de la *inulina de agave* y los iones de plata contenidos en la solución para la formación de una mayor cantidad de AgNPs en menor tiempo.

Posteriormente se eligió el diseño más adecuado para hacer el ajuste de un modelo de segundo orden. Así, se realizó el diseño de experimentos Box-Benhken, en el que se consideró una variable de respuesta dada por la absorbancia máxima de las nanopartículas alrededor de 400 nm y cuatro factores experimentales o variables independientes; A concentración de *inulina de agave* en mg/mL, B concentración del AgNO<sub>3</sub> en mM, C valor de pH y D temperatura en °C. Además, se consideraron 5 puntos centrales y, de acuerdo con el diseño, en total se realizaron  $N = 2(4)(4 - 1) + 5 = 29$  experimentos.

En la tabla 7 se presentan los cuatro factores experimentales con sus correspondientes tres niveles en forma natural y codificada. Los niveles de los factores fueron seleccionados con base al conocimiento adquirido de los experimentos iniciales en el proceso de optimización tradicional. Más adelante, en la tabla 8 se exhiben las configuraciones de los 29 experimentos a preparar, requeridos y propuestos por el diseño, los cuales fueron generados por el programa estadístico Design-Expert 7.0.0.

**Tabla 7.** Factores experimentales con sus correspondientes tres niveles del Diseño Box-Benhken.

Factor	Nombre	unidades	Niveles codificados y naturales		
			-1 (nivel bajo)	0 (nivel medio)	+1 (nivel alto)
A	<i>Inulina de agave</i>	mg/mL	1	5	9
B	AgNO <sub>3</sub>	mM	0.05	0.125	0.2
C	pH	-	10	11	12
D	Temperatura	°C	23	61.5	100

**Tabla 8.** Diseño de experimentos Box-Benhken obtenido con Design-Expert 7.0.0, considerando una variable de respuesta, cuatro factores experimentales y 5 puntos centrales.

Muestras	Punto	A	B	C	D	Absorbancias máximas centradas alrededor de 400 nm
						Valor real
E1		1	0.200	11	61.5	
E2		1	0.125	11	100	
E3		1	0.125	10	61.5	
E4		5	0.200	11	100	
E5		1	0.050	11	61.5	
E6		1	0.125	12	61.5	
E7		9	0.200	11	61.5	
E8		5	0.050	12	61.5	
E9		9	0.125	11	100	
E10		5	0.050	11	100	
E11		1	0.125	11	23	
E12	central	5	0.125	11	61.5	
E13		5	0.125	10	23	
E14		9	0.125	11	23	
E15		5	0.125	12	23	
E16	central	5	0.125	11	61.5	
E17		5	0.200	10	61.5	
E18		5	0.200	12	61.5	
E19		5	0.050	11	23	
E20		9	0.125	10	61.5	
E21		5	0.125	10	100	
E22	central	5	0.125	11	61.5	
E23		9	0.125	12	61.5	
E24		5	0.200	11	23	
E25		5	0.125	12	100	
E26	central	5	0.125	11	61.5	
E27	central	5	0.125	11	61.5	
E28		9	0.050	11	61.5	
E29		5	0.050	10	61.5	

A: Concentración de *inulina de agave* (mg/mL), B: concentración de AgNO<sub>3</sub> (mM), C: pH y D: temperatura (°C).

En consecuencia, se prepararon en el laboratorio 29 experimentos (columna 1) cuyo contenido fue con base en la propuesta del diseño, con sus correspondientes concentraciones de *inulina de agave* (columna 3), de AgNO<sub>3</sub> (columna 4), pH (columna 5) y temperatura (columna 6). La elaboración de los experimentos se hizo siguiendo los mismos protocolos empleados en el método tradicional. Una hora después se midió la absorbancia, dato a registrar en la última columna de la tabla 8.



Una vez con la información experimental de la variable de respuesta, es decir, las absorbancias máximas, en el programa Design-Expert 7.0.0 se realizó el tratamiento matemático-estadístico de los datos y se ajustó el modelo de segundo orden que mejor describió la variable de respuesta. Posteriormente con el modelo se hizo un análisis sobre el efecto de los factores e interacción entre los factores sobre la variable de respuesta.

#### 4.4 Técnicas de caracterización

Para monitorear la producción de AgNPs se midieron sus absorbancias mediante Espectrofotometría UV-Vis. La forma y tamaño de las AgNPs obtenidas se verificaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET). También, las micrografías adquiridas con el MET, fueron trabajadas con el editor de fotografías Photoshop, dejando a las nanopartículas seleccionadas, pintadas de color negro. Posteriormente, con un programa editor de procesamiento digital de imagen ImajeJ se obtuvo las áreas en pixeles de las nanopartículas. Finalmente, considerando las áreas como un círculo por medio del programa Origin se obtuvo la distribución de tamaños. Además, las distribuciones de tamaño se ajustaron a la función de distribución log-normal definida en la ecuación (13) con media  $\bar{x}$  y desviación estándar  $\sigma$ .

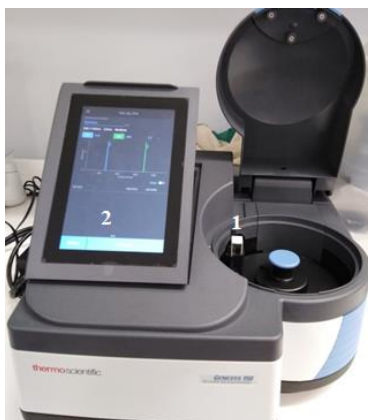
$$f(x) = \frac{A}{\sigma x \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln(\frac{x}{\bar{x}}))^2}{2\sigma^2}}. \quad (13)$$

##### 4.4.1 Espectrofotometría Ultravioleta-Visible

La espectrofotometría de absorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis) es una técnica comúnmente empleada para caracterizar AgNPs. Con ella se mide la cantidad de radiación ultravioleta y visible que es absorbida por la muestra de nanopartículas en función de la longitud de onda. Es útil para identificar y determinar la concentración de este tipo de nanopartículas y otras sustancias químicas. La absorción de radiación UV-Vis se basa en las transiciones electrónicas entre niveles energéticos de los átomos de la muestra (Olsen, 1986).

Para aplicar esta técnica se usan diversos tipos de espectrofotómetros. En nuestro caso utilizamos uno de haz sencillo GENESYS 150 marca Thermo Scientific (figura 15), usando un rango de longitud de onda de 300 a 800 nm para el análisis. Su funcionamiento básico se ilustra en la figura 16, en el que se indica que el equipo consta de una fuente de radiación, monocromador, porta muestra, detector de luz y una computadora.

La radiación emitida por la fuente (que generalmente es una lámpara de deuterio para el rango espectral UV y una de tungsteno para los rangos VIS e IR) es enfocada al monocromador, el cual selecciona un color para hacer un escaneo en un rango de frecuencia deseado. Posteriormente esta intensidad de luz  $I_0$ , se hace incidir sobre la muestra. Dependiendo de su composición, ésta absorbe cierto porcentaje de radiación de longitudes de onda específicas. Enseguida, un detector de luz (que generalmente es un fotomultiplicador para el rango UV-Vis y una celda SPb para el rango IR) se encarga de medir la intensidad,  $I$ , de cada haz monocromático después de atravesar la muestra. Finalmente, en una computadora o pantalla se registra el espectro de absorción. Y con el logaritmo del cociente de estas intensidades de radiación se calcula la absorbancia de la muestra. Por tanto, con el espectrofotómetro se puede obtener un espectro de absorbancia con respecto a la longitud de onda (Sánchez, 2020).



**Figura 15.** Espectrofotómetro UV-Vis de haz sencillo GENESYS 150 marca Thermo Scientific (Sánchez, 2020, p. 42).

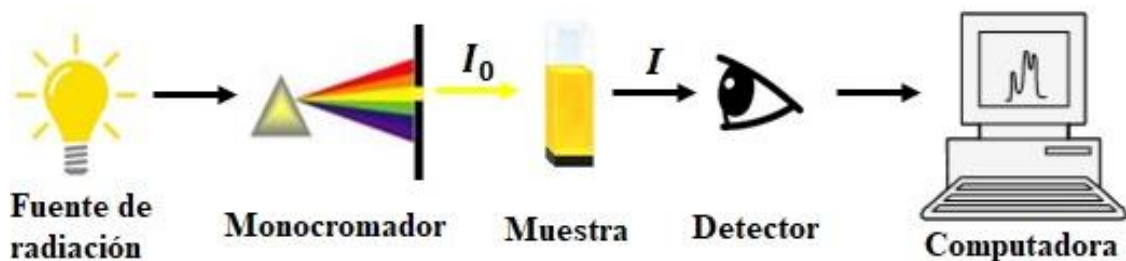


Figura 16. Esquema básico de un espectrofotómetro UV-Vis de haz sencillo (Sánchez, 2020, p. 41).

#### 4.4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La microscopía electrónica de transmisión es una técnica de caracterización que consiste en detectar y estudiar las señales producidas por la interacción de un haz de electrones con una muestra de interés. Dichas señales dan información sobre la composición y morfología de la muestra.

La fuente del microscopio emite un haz de electrones de alta energía, 80-300 keV, equivalente a longitudes de onda entre 0.001 y 0.1 nm, que son enfocados y dirigidos por lentes electromagnéticas hacia la muestra. Con los electrones que atraviesan la muestra se forman imágenes o micrografías de alta resolución en dos dimensiones. De manera que, con esta técnica se obtuvieron micrografías que evidenciaron la forma de las NPs, su tamaño y aglomeración. Para esto, se utilizó un microscopio electrónico de transmisión JOEL JEM-2010 (figura 17) que opera con un potencial de 100 kV, ubicado en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNYN-UNAM). La muestra se preparó goteando la solución con AgNPs sobre una rejilla de cobre de 3 mm de diámetro, esta se dejó secar a temperatura ambiente y luego se colocó en el microscopio para su análisis.



**Figura 17.** Microscopio electrónico de transmisión JOEL JEM-2010 (Sánchez, 2020, p. 44).

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se discuten los resultados obtenidos sobre el efecto de la concentración de *inulina de agave* y del  $\text{AgNO}_3$ , la temperatura y el pH en la tasa de formación de las AgNPs. En primer lugar, se presentan los resultados del estudio por el método tradicional. En segundo lugar, los resultados logrados por el método de Metodología de Superficie de Respuesta.

#### 5.1 Optimización por el método tradicional

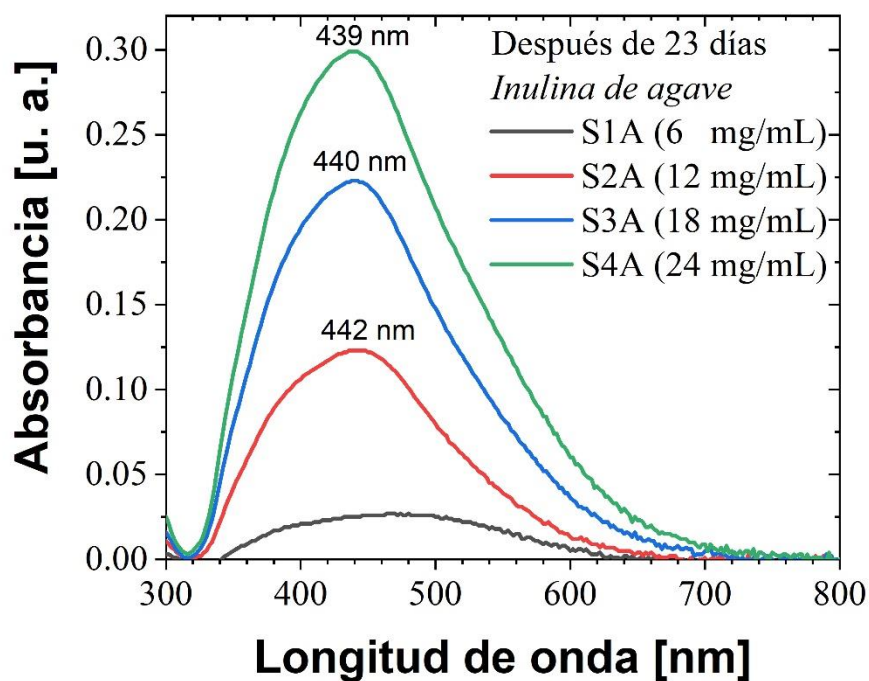
##### 5.1.1 Efecto de la *inulina de agave* en la síntesis

En la figura 18 se presenta la medición de absorbancia UV-Vis de las muestras S1A, S2A, S3A y S4A con diferente concentración de *inulina de agave* a los 23 días de su preparación. Contenido y parámetros de cada muestra están en la tabla 1, sección 4.1.1 (capítulo 4, detalles experimentales). Las muestras S2A, S3A y S4A exhiben un pico de absorción en 442, 440 y 439 nm, respectivamente, lo cual significa que en las tres muestras hay formación de AgNPs de forma cuasi esférica (Oseguera, *et al.*, 2012). Sin embargo, para la S1A con menos cantidad de *inulina de agave*, el pico de absorción no aparece, lo que sugiere una formación de nanopartículas muy baja o nula. Esto, a pesar de que S1A fue preparada con la misma concentración molar de  $\text{AgNO}_3$ . Por consiguiente, podemos decir que la cantidad de moléculas de *inulina de agave* juegan un papel clave en la formación de nanopartículas.

La hidrólisis de la *inulina de agave* es relativamente estable a temperatura ambiente y pH neutro, por lo que, al añadir agua, la cadena de inulina sufre una escisión de los enlaces glucosídicos y finalmente se descompone en sus monosacáridos (Barclay, *et al.*, 2016). Esto conduce a la formación de iones hidroxilo (Autino, *et al.*, 2013), los cuales tienen un  $e^-$  por

compartir, fomentando así la reducción de los iones de  $\text{Ag}^+$  a su estado neutro  $\text{Ag}^0$ , y a la subsecuente formación de AgNPs. Por ejemplo, se ha considerado que este polisacárido natural contribuye en la reducción y estabilización de AgNPs (Zhang, *et al.*, 2018).

También, en la figura 18 se pueden apreciar dos diferencias en el perfil de las absorbancias, primero, las nanopartículas obtenidas con mayor concentración de *inulina de agave* influyen en intensificar el máximo de absorción. De acuerdo con la relación de Lambert-Beer, ecuación (12), esto puede estar asociado con un aumento en la concentración de nanopartículas. Segundo, el pico de absorción está desplazado ligeramente hacia una longitud de onda más corta, lo que sugiere, con base en la Teoría de Mie, una ligera disminución del tamaño de las nanopartículas.

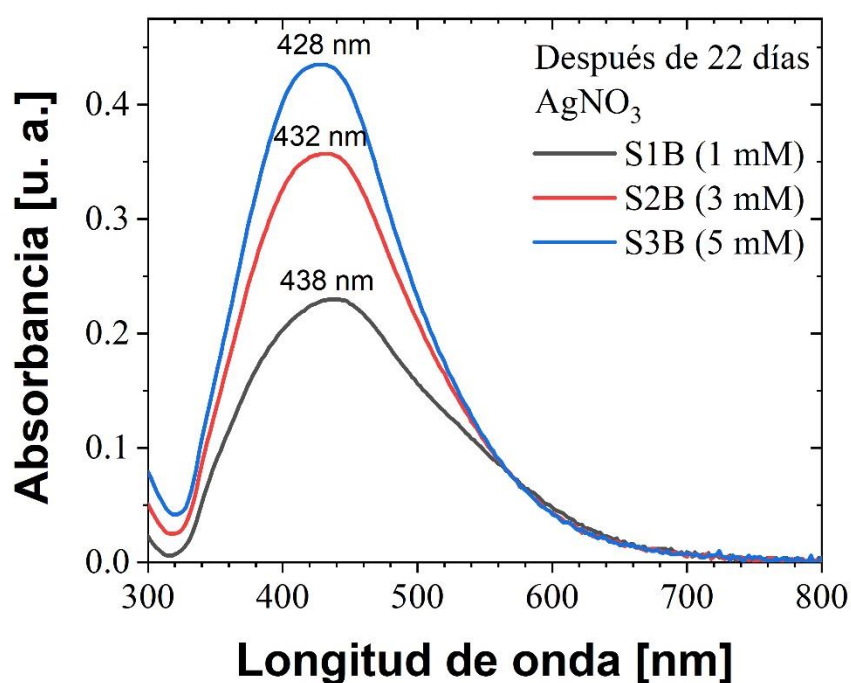


**Figura 18.** Absorbancia UV-Vis de nanopartículas obtenidas usando diferentes concentraciones de *inulina de agave*.

### 5.1.2 Efecto del $\text{AgNO}_3$ en la síntesis

En la figura 19 se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las muestras S1B, S2B y S3B con diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  a los 22 días de su preparación. Contenido

y parámetros de cada muestra están en la tabla 2 de la sección 4.1.2 (capítulo 4, detalles experimentales). De manera similar a la *inulina de agave*, el aumento en la concentración de  $\text{AgNO}_3$  tuvo un efecto en la intensificación y en el corrimiento del pico de absorción a longitudes de onda más cortas. La muestra con menor concentración de  $\text{AgNO}_3$ , S1B, exhibe un pico de menor intensidad centrado en 438 nm y para la muestra de mayor concentración, S3B, el pico es más intenso en 428 nm. Esto se puede explicar a través del factor de la concentración y del tamaño de las AgNPs (Oseguera, *et al.*, 2020).



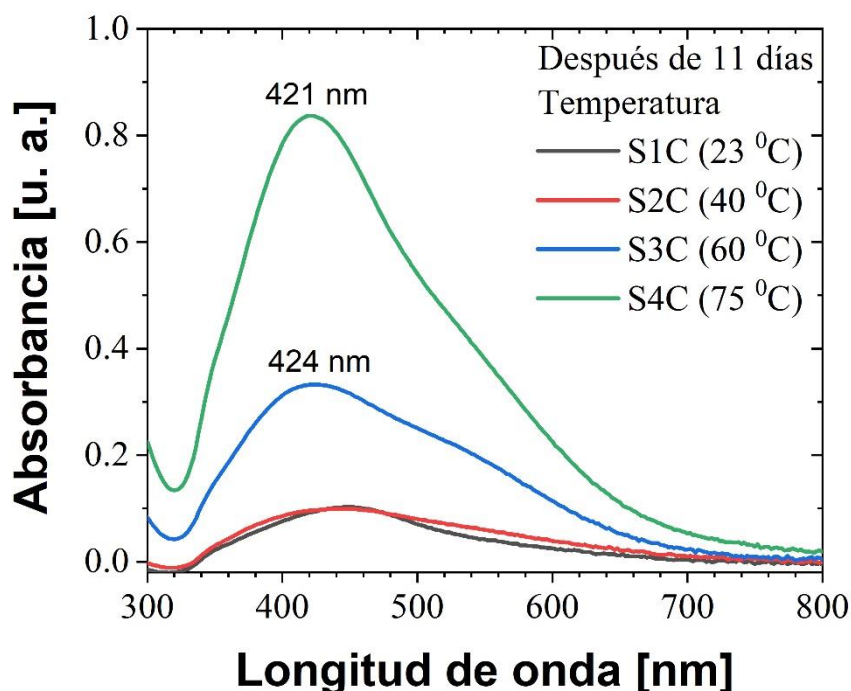
**Figura 19.** Absorbancia UV-Vis de nanopartículas obtenidas usando diferentes concentraciones de  $\text{AgNO}_3$ .

### 5.1.3 Efecto de la temperatura en la síntesis

En la figura 20 se presentan las absorbancias de las muestras S1C, S2C, S3C y S4C obtenidas a diferente temperatura, al cabo de los 11 días de haber sido preparadas. Contenido y parámetros de cada muestra están en la tabla 3 de la sección 4.1.3 (capítulo 4, detalles experimentales).

Las muestras S1C y S2C son las que presentan menor absorción alrededor de 400 nm, lo que significa que hay poca formación de AgNPs a una temperatura menor o igual a 40 °C.

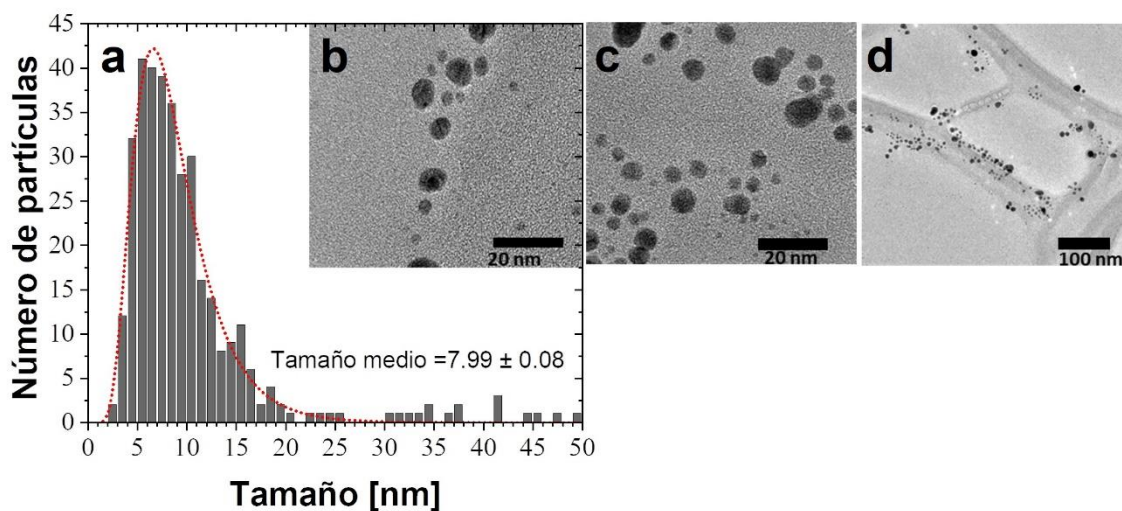
Por el contrario, la muestra S3C, obtenida a 60 °C, exhibe un pico de absorción más intenso. Sin embargo, a 75 °C, la absorbancia de la muestra S4C es aún mayor, incluso, su valor es el más alto en comparación con los resultados de absorbancia presentados en el efecto de la concentración de *inulina de agave* y del AgNO<sub>3</sub> (figuras 18 y 19). Por lo tanto, la temperatura influye en acelerar la tasa de formación de nanopartículas. Este resultado concuerda con el artículo publicado por Song, J. Y. y Kim, B. S. (2008), quienes mencionan que el incremento en la tasa de formación se debe a que al aumentar la temperatura se aumenta la velocidad de reacción, lo que lleva, además, a que la mayoría de los iones de plata Ag<sup>+</sup> se consuman en la formación de las nanopartículas.



**Figura 20.** Absorbancia UV-Vis de nanopartículas obtenidas usando diferentes temperaturas.

Por otra parte, en la figura 21 se presenta la distribución de tamaños ajustada con el modelo log-normal y tres micrografías de las nanopartículas obtenidas con una temperatura de 75 °C (muestra S4C). Para este análisis se consideraron 354 partículas, donde la mayoría de ellas son de un tamaño menor a 10 nm y de un tamaño promedio de 7.99 nm. De acuerdo con las micrografías, las nanopartículas son de forma cuasi esférica. El resultado refuerza la interpretación hecha para el perfil del pico de absorción, en la que se infirió la forma de la nanopartícula.

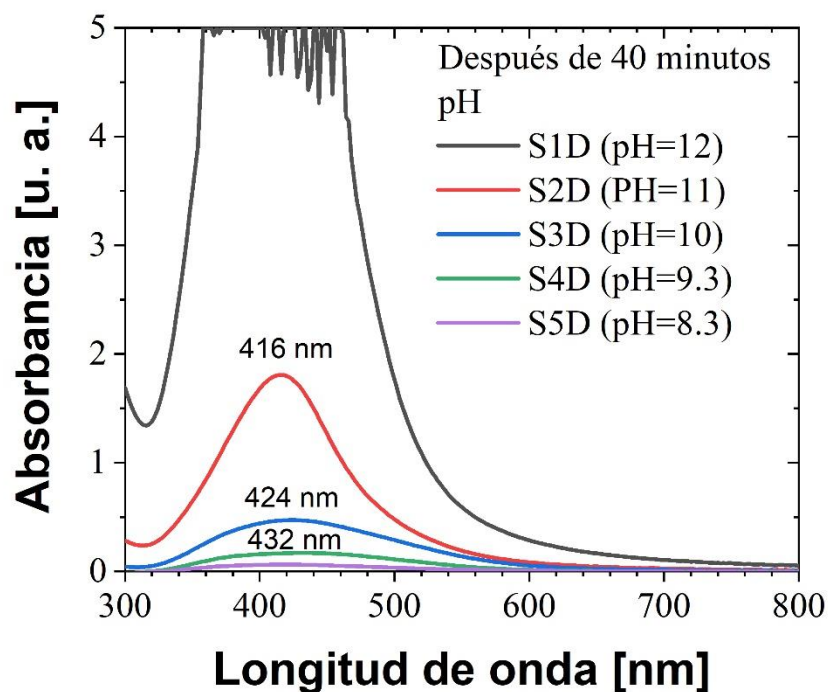




**Figura 21.** (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas, la b, c y d) de AgNPs obtenidas con una temperatura de 75 °C.

#### 5.1.4 Efecto del pH en la síntesis

En la figura 22 se presentan los espectros de absorbancia UV-Vis de las muestras S1D, S2D, S3D, S4D y S5D obtenidas a diferente pH, a los 40 minutos de su preparación. Contenido y parámetros de cada muestra están en la tabla 4 de la sección 4.1.4 (capítulo 4, detalles experimentales). El incremento de la absorbancia alrededor de 400 nm depende del pH. Cabe destacar que la muestra con pH=11 (S2D) registra una absorbancia de 1.7, valor muy superior al obtenido para la muestra preparada a una temperatura de 75 °C (S4C, curva verde en la figura 20). Esto indica que, con pH=11 se acelera bastante la tasa de formación y, además, la posición del pico a una longitud de onda menor sugiere la presencia de una mayor cantidad de nanopartículas pequeñas. Sin embargo, para la muestra obtenida con pH=12 (S1D), la absorbancia alrededor de 400 nm fue tan intensa, que está fuera del rango de medición del espectrofotómetro, por lo que no fue posible observar su centro. En comparación con los otros parámetros previamente discutidos, esto indica que el pH=12 tiene un efecto predominante en acelerar la formación de nanopartículas, y es un valor óptimo para obtener una gran producción de AgNPs. Este resultado tiene correlación con el color oscuro observado en la muestra, debido a que interfirió en medir la intensidad de luz transmitida.

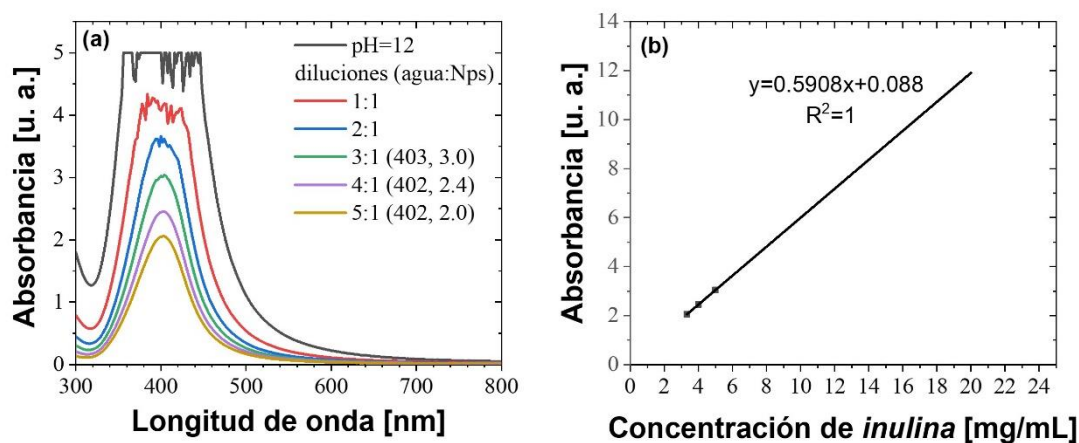


**Figura 22.** Absorbancia UV-Vis de las nanopartículas obtenidas utilizando diferentes valores de pH.

Con el propósito de conocer el pico de absorción de la muestra S1D, ésta se diluyó con agua destilada mediante la siguiente proporción; 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 y 5:1, donde el primer número corresponde a los mililitros de agua destilada diluida con 1 mililitro de solución de AgNPs. En la figura 23(a) se presentan los espectros de absorción UV-Vis de cada una de las diluciones. Se puede observar que la cantidad de agua destilada añadida tiene efecto en el pico de absorción de la muestra, el cual está centrado en 402 nm. En otras palabras, la muestra S1D contiene AgNPs y conforme fue diluida con agua disminuyó su concentración. También, al comparar el centro de su máxima absorción con los de las muestras sintetizadas a un menor pH (figura 22), está centrado a una longitud de onda menor, por lo tanto, el pH tiene efecto en formar más cantidad de nanopartículas de menor tamaño.

Para conocer el alcance de la absorbancia máxima de la muestra original y de las diluciones realizadas se obtuvo una línea de calibración, la cual se puede apreciar en la figura 23(b). Con este gráfico de regresión lineal se obtienen valores aproximados de las absorbancias máximas de cada una de las diluciones y de la muestra original (ver tabla 9). De ello se infiere que la muestra original (S1D) presenta una absorbancia máxima de 11.9,

centrada en 402 nm, lo que sugiere que no hubo cambio significativo en el tamaño de las nanopartículas, pero si un cambio importante en su concentración.



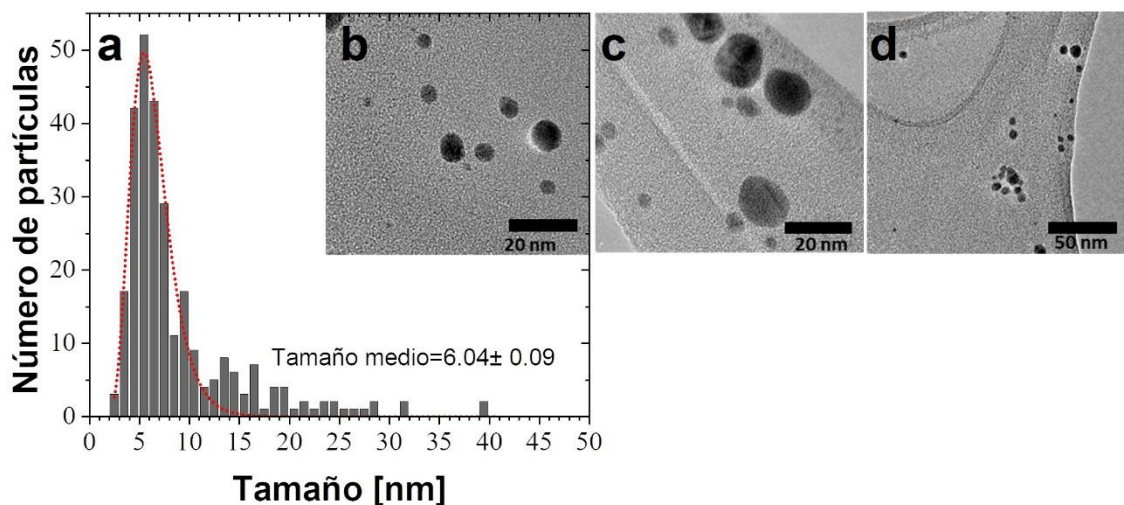
**Figura 23.** (a) Espectros UV-Vis de nanopartículas obtenidas con un pH=12 utilizando diferentes soluciones en agua destilada. (b) Línea de calibración de absorbancia máxima vs concentración de *inulina de agave*.

**Tabla 9.** Absorbancias máximas del experimento original y sus diluciones.

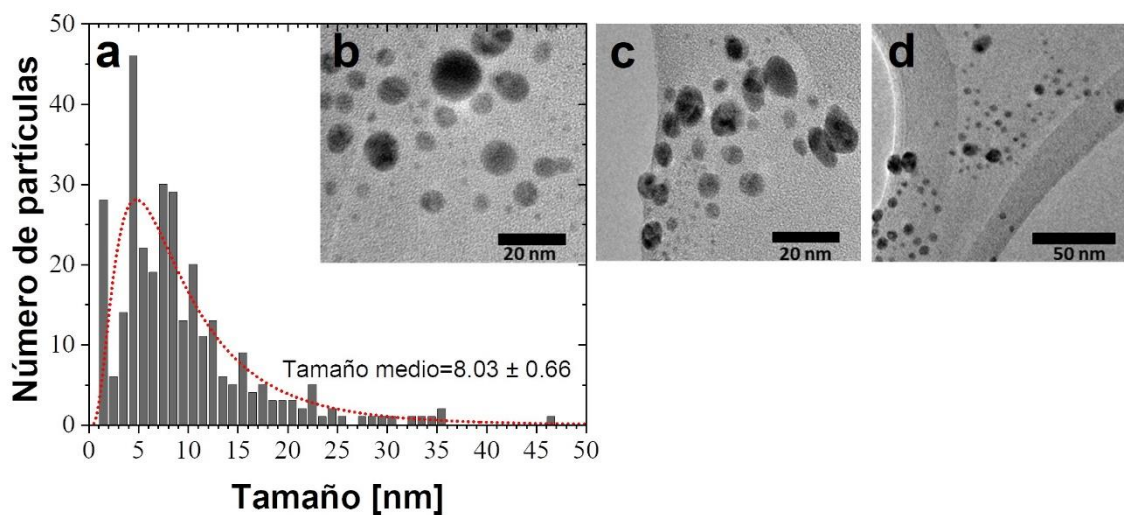
Diluciones	Absorbancia máxima medida en 402 nm	Absorbancia máxima, aproximada por el modelo de regresión lineal
Sin diluir (original)	-	<b>11.904</b>
1:1	-	<b>5.996</b>
2:1	-	<b>4.026</b>
3:1	3.041	2.907
4:1	2.453	2.441
5:1	2.056	2.131

Adicionalmente, en la figura 24 se presenta una distribución de tamaños de las AgNPs obtenidas con pH=11 (muestra S2D). Para la estadística se tomaron en cuenta 282 nanopartículas, resultando un tamaño promedio de 6.04 nm. Por otra parte, en la figura 25 se presenta la distribución de tamaños de las AgNPs obtenidas con un pH de 10 (muestra S3D). Para esta estadística se tomaron en cuenta 311 nanopartículas, dando como resultado un tamaño promedio de 8.03 nm. Al comparar ambas distribuciones se puede notar que las formas de las partículas son casi idénticas, de forma cuasi esférica, pero la distribución de tamaño de las nanopartículas obtenidas con un pH de 11 es más estrecha y las nanopartículas son más pequeñas. Este resultado es similar al artículo publicado sobre el efecto del pH en la

síntesis de AgNPs usando ácidos cítrico y málico debido a que el tamaño promedio de las nanopartículas disminuye a valores de pH de 10 a 11 (Marciniak, *et al.*, 2020).



**Figura 24.** (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas b, c y d) de AgNP obtenidas con pH=11.



**Figura 25.** (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas b, c y d) de AgNP obtenidas con pH=10.

El NaOH juega un papel muy importante en la intensificación de la tasa de formación de nanopartículas. Se trata de una base fuerte que se disocia completamente en solución para formar iones hidroxilo (Herrera, E., *et al.*, 2014). Entonces, una elevada cantidad de estos iones en la solución acuosa de inulina conduce a un incremento de su pH, lo que influye

directamente en un notable aumento en la velocidad de ruptura de los enlaces glucosídicos que unen las unidades de fructosa que componen la *inulina* (Barclay, T., *et al.*, 2016). Posteriormente, al existir un mayor número de unidades de fructosa, existe un mayor número de moléculas reductoras que inmediatamente tienden a ceder electrones a los iones  $\text{Ag}^+$  para ser reducidos a  $\text{Ag}^0$  (Autino, J. C., *et al.*, 2013), y en consecuencia se produce una rápida formación de AgNPs. Además, con una mayor cantidad de moléculas reductoras se aprovechan al máximo los iones  $\text{Ag}^+$  disponibles para ser reducidos.

Al comparar las gráficas de las figuras 18, 19, 20 y 22 podemos constatar que la temperatura y el pH son los factores que más aceleran la formación de AgNPs, siendo el pH el de más influencia. Sin embargo, la síntesis de las AgNPs puede ser más fácil sin ajustar el pH y su temperatura, usando únicamente de ingredientes *inulina de agave*,  $\text{AgNO}_3$  y agua destilada. Aunque, en este último caso, es muy importante considerar el efecto del tiempo de almacenamiento, ya que, si la muestra se usa inmediatamente después de la síntesis, se estará empleando una concentración de nanopartículas menor a la esperada.

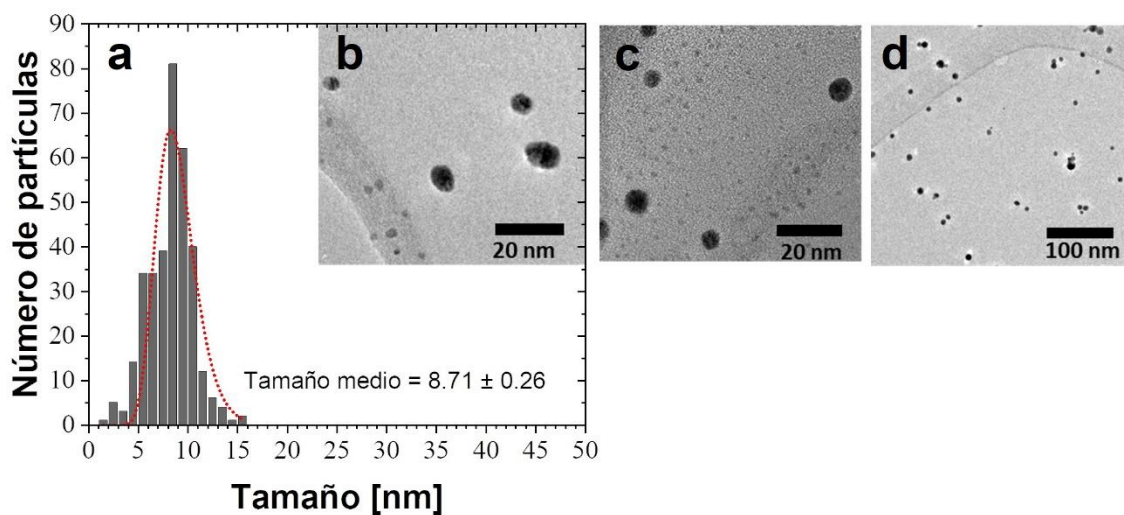
## 5.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata

Se ha informado que las propiedades bactericidas dependen tanto del tamaño como de la concentración de las nanopartículas. Por ejemplo, si las AgNPs son de un diámetro de aproximadamente 1-10 nm, presentan una interacción directa con las bacterias (Morones, *et al.*, 2005). En cuanto a su concentración, ésta también afecta en combatir a la bacteria (Agnihotri, *et al.*, 2014; Ma L, *et al.*, 2017; Maldonado, *et al.*, 2021).

Para este estudio bactericida fueron sintetizadas dos muestras de AgNPs,  $\text{S1}_{\text{bac}}$  y  $\text{S2}_{\text{bac}}$ , con una concentración molar de 10 mM y 1 mM de  $\text{AgNO}_3$ , en disolución con 60 mg/mL y 20 mg/mL de *inulina de agave*, respectivamente. Ambas, ajustadas con pH=12 y a temperatura ambiente (para detalles de la preparación ver sección 4.2 de detalles experimentales). Además, debido a que la muestra  $\text{S1}_{\text{bac}}$  evidenció actividad antibacteriana, se hizo la siguiente consideración teórica para obtener su concentración de nanopartículas en unidades de nanopartículas/mL.

Para ello, es necesario conocer el tamaño promedio de la nanopartícula, el cual se puede estimar a partir del análisis de las micrografías tomadas por MET. En la figura 26 se presenta la distribución de tamaños y tres micrografías de la muestra S1<sub>bac</sub>, al igual que en las anteriores micrografías, las nanopartículas son cuasi esféricas. Sin embargo, con la diferencia de que presenta una distribución de tamaños más angosta y diámetro promedio de  $D_p = 8.71$  nm. También, considerando que la nanopartícula tiene forma esférica, su masa se puede calcular con la fórmula  $m_p = \frac{\pi}{6} D_p^3 \rho_{Ag}$ , donde  $\rho_{Ag}$  representa la densidad de la plata ( $10.49 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ). Al sustituir la densidad y el diámetro, se obtiene una masa promedio de nanopartícula de  $m_p = 3.6293 \times 10^{-15}$  mg.

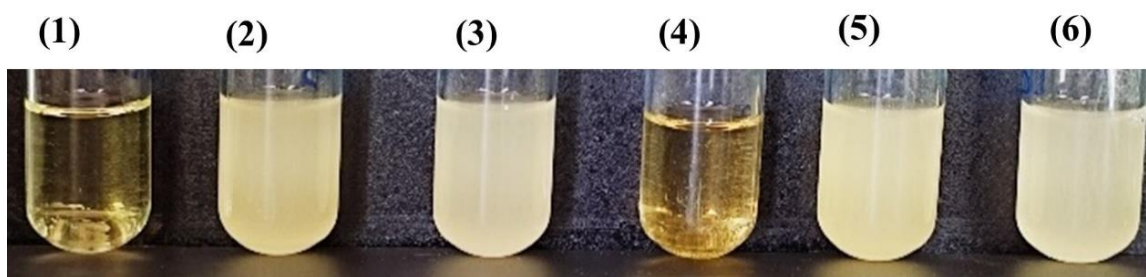
Por otra parte, la concentración de plata en la muestra viene dada por  $C_{Ag} = MW_{Ag} \cdot C_{AgNO_3}$ , donde  $MW_{Ag}$  es el peso atómico de la plata ( $107.8682 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y  $C_{AgNO_3}$  es la concentración de  $\text{AgNO}_3$  (10 mM). Sustituyendo se obtiene,  $C_{Ag} = 1.07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Finalmente, al dividir esta concentración por la masa promedio, la concentración de nanopartículas es de aproximadamente  $2 \times 10^{14}$  nanopartículas/mL.



**Figura 26.** (a) Distribución de tamaños, ajustado con un modelo log-normal (línea punteada), de varias micrografías (entre ellas b, c y d) de AgNP obtenidas con pH=12 (muestra S1<sub>bac</sub>).

En la figura 27 se presenta una fotografía de los tubos de ensayo con las disoluciones para estudiar el efecto bactericida de las muestras S1<sub>bac</sub> y S2<sub>bac</sub>. El contenido de cada tubo está en la tabla 6 de la sección 4.2 de detalles experimentales y en el pie de la figura 27.

Básicamente, todos los tubos contienen medio LB y los tubos del 2 al 6 contienen la bacteria *Escherichia Coli*. Adicionalmente, los tubos 3 y 6 tienen solución de *inulina de agave* para descartar su efecto antibacteriano. En tanto los tubos 4 y 5 son los que contienen las muestra S1<sub>bac</sub> y S2<sub>bac</sub>, respectivamente. A simple vista, el tubo 4 a diferencia de los demás tubos con la bacteria, no presenta turbidez, ni un color blancuzco, mostrando así actividad antibacteriana. Por consiguiente, las AgNPs de la muestra S1<sub>bac</sub>, causó daño a la *E. coli*, siendo entonces importante el factor de la concentración de nanopartículas. Por este motivo, se utilizará la muestra S1<sub>bac</sub> como trabajo a futuro en el estudio de su efecto contra la bacteria *E. coli*.



**Figura 27.** Tubos para estudiar el efecto bactericida de las AgNPs. 1) Control positivo: medio LB. 2) Control negativo: medio LB y 100  $\mu$ L de *E. coli*. 3) Medio LB, 100  $\mu$ L de *E. coli* y 100  $\mu$ L de *inulina de agave*. 4) Medio LB, 100  $\mu$ L de *E. coli* y 100  $\mu$ L de AgNPs (S1<sub>bac</sub>). 5) Medio LB, 100  $\mu$ L de *E. coli* y 100  $\mu$ L de AgNPs (S2<sub>bac</sub>). 6) Medio LB, 100  $\mu$ L de *E. coli* y 100  $\mu$ L de *inulina de agave*.

Aunque existe un desconocimiento sobre el mecanismo bactericida de las AgNPs, se sabe que existe unión e interacción de las nanopartículas con la pared celular, la membrana y el ADN de la bacteria (Morones, *et al.*, 2005; Kim, J. S., *et al.*, 2007). Se ha demostrado que existe atracción electrostática entre la membrana celular de la bacteria con carga negativa y las AgNPs con carga positiva, por lo que la actividad bactericida está directamente relacionada con la carga positiva de los iones de plata (Dibrov, P., *et al.*, 2002; Hamouda, T., *et al.*, 2001). De igual manera, se cree que existe una afinidad entre las AgNPs y el azufre y fósforo contenidos en las proteínas de la membrana y en el ADN del interior de la célula (Morones, *et al.*, 2005).

También, se ha reportado que la concentración de AgNPs está muy relacionada con la formación de “agujeros” en la pared celular bacteriana en bacterias gramnegativas como *E. coli.*, lo que puede provocar la permeabilidad de la membrana celular y causar la muerte

de la bacteria (Sondi, I., & Salopek-Sondi, B., 2004). Otra explicación sugiere que el agotamiento de la plata podría desencadenar la liberación progresiva de lipopolisacáridos y proteínas de la membrana celular, lo que lleva a la formación de "agujeros" (Amro, N. A., *et al.*, 2000). Por otra parte, se ha propuesto que los iones de plata liberados de las AgNPs pueden inactivar la replicación del ADN y la inhibición de las funciones enzimáticas, debido a su interacción con los restos de fósforo en el ADN (Gupta, P., *et al.*, 2008).

Los resultados presentados hasta aquí fueron publicados en una revista de circulación internacional, el artículo tiene por nombre *Eco-friendly high-rate formation of silver nanoparticles in agave inulin and its bactericidal effect against Escherichia coli*, el cual se anexa en los productos derivados de este trabajo (Sánchez *et al* 2024).

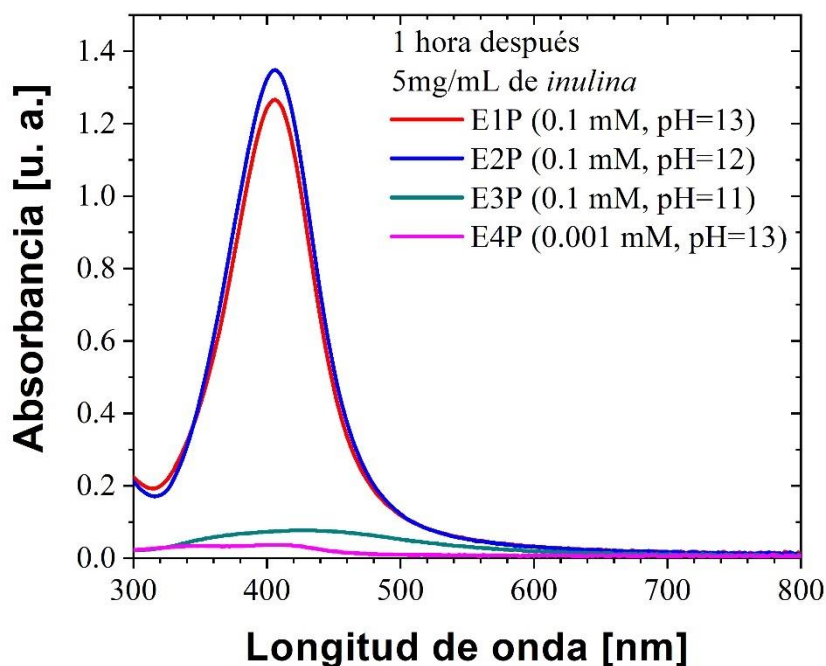
### **5.3 Optimización por la Metodología de Superficie de Respuesta**

Con base en la información obtenida de la optimización por el método tradicional y 4 experimentos adicionales (E1P, E2P, E3P y E4P), se eligieron los mismos factores experimentales para estudiar su efecto en la tasa de formación de las AgNPs, pero a cada uno se le asignaron nuevos valores o niveles. Los nuevos valores o niveles de cada factor aparecen en la tabla 7 de la sección 4.3. Con dichos factores y sus nuevos valores se realizó un diseño de experimentos Box-Benhken, el cual sugirió la preparación de 29, el contenido de cada uno está en la tabla 8 de la sección 4.3 (capítulo 4, detalles experimentales).

Con los 4 experimentos adicionales se exploraron nuevas combinaciones entre valores altos de pH y mínimas concentraciones de *inulina de agave* y de  $\text{AgNO}_3$ . En el caso del pH fueron considerados valores altos, entre 11 y 13, debido a su efecto para acelerar la formación de AgNPs. Por su parte, se eligieron cantidades mínimas para las concentraciones de *inulina de agave* (5 mg/mL) y de  $\text{AgNO}_3$  (0.1 y 0.001 mM) con la finalidad de identificar que cantidades evitan que el pico de absorción sobrepasase el rango de medida del espectrofotómetro, a partir de la solución inicial, ya que de lo contrario se tendría que recurrir a diluir con agua destilada, como se hizo en el método tradicional, con la diferencia de que en la Metodología de Superficie de Respuesta son 29 experimentos, dificultando así su estudio.



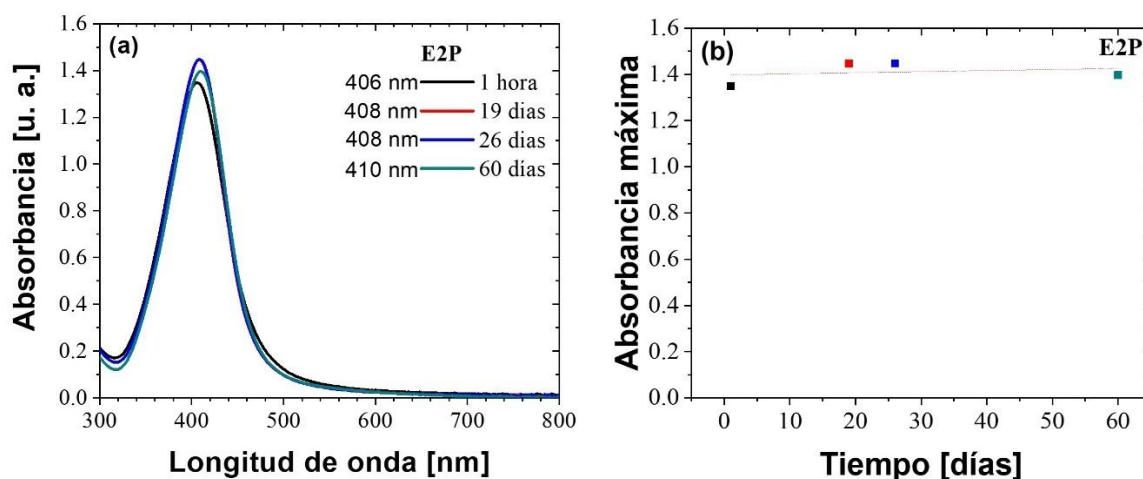
En la figura 28, se presentan las absorbancias de los 4 experimentos (E1P, E2P, E3P y E4P), una hora después de su elaboración. Los experimentos E3P y E4P no presentan el pico de absorción, por tanto, hay poca o nula formación de AgNPs. En el caso de E4P, esto ocurrió a pesar de que se usó un valor de pH=13, sin embargo, contiene la mínima concentración molar de  $\text{AgNO}_3$ , por ende, hay menos cantidad de átomos de plata. Por su parte en el experimento E3P, si bien es cierto que se considera más cantidad de  $\text{AgNO}_3$  en la solución, ahora corresponde a la de menor pH. En tanto, los experimentos E2P y E1P de un pH más alto, 12 y 13, respectivamente, presentan el pico de absorción alrededor de 400 nm. En consecuencia, para nuestro estudio por la MSR se eligieron pH entre 10 y 12 y concentraciones de 1 a 9 mg/mL de *inulina de agave* y de 0.05 a 0.2 mM de  $\text{AgNO}_3$ .



**Figura 28.** Absorbancia UV-Vis de las AgNPs biosintetizadas en los 4 experimentos adicionales, con valores altos de pH y mínimas concentraciones de *inulina de agave* y de  $\text{AgNO}_3$ .

Además, con la finalidad de verificar la tasa de formación y estabilidad de las AgNPs formadas, se monitoreo la absorbancia del experimento E2P durante 60 días (curva azul de la figura 28). En la figura 29(a) se presenta su absorbancia a una hora, a los 19, 26 y 60 días de haber elaborado el experimento. El perfil del espectro es similar, debido a que hay ligeros

cambios en cuanto al ancho, incremento y desplazamiento del máximo de absorción. Esto significa que en este periodo de almacenamiento no hubo un cambio significativo en la forma y en el tamaño de las AgNPs. Adicionalmente, en la figura 29(b) se muestra la evolución que tuvieron las absorbancias máximas con el tiempo, en ella se puede notar que, desde la primera medición, que fue en la primera hora, hasta 60 días después no hay notable incremento y decremento, por lo que se puede inferir que la mayor producción de AgNPs fue en la primera hora y permanecieron en suspensión estable hasta los 60 días.



**Figura 29.** (a) Absorbancia UV-Vis de las AgNPs sintetizadas en el E2P con 5 mg/mL de *inulina de agave*, 0.1 mM de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{pH}=12$ . (b) Datos de su máxima absorbancia en función del tiempo.

Por otra parte, si se comparan los espectros de absorción de la figura 29(a) con los de las figuras 18, 19 y 20, la cual corresponde a los resultados del efecto de la *inulina de agave*, del  $\text{AgNO}_3$ , y de la temperatura por el método tradicional. El pico de absorción de la figura 29(a) está centrado en una longitud de onda más corta y es más angosto, indicando más cantidad de nanopartículas de menor tamaño y una distribución de tamaños más estrecha.

En acuerdo con este análisis, se considera que en los experimentos realizados en el estudio de optimización con la MSR se va a formar la mayor cantidad de AgNPs posibles en cada uno de ellos. Además, las AgNPs serán de tamaños muy pequeños y se finalizará su síntesis en un lapso máximo de una hora. Asimismo, se espera que todos se mantengan estables por al menos dos meses. Aunque estos resultados pueden variar un poco al incluir el factor de la temperatura.

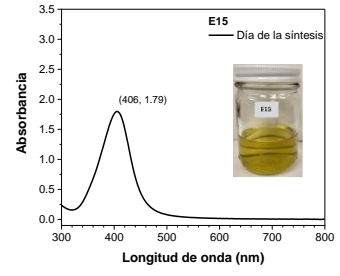
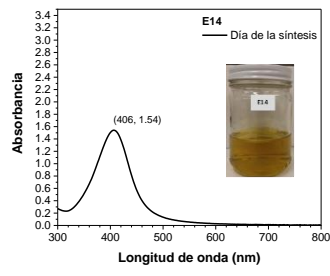
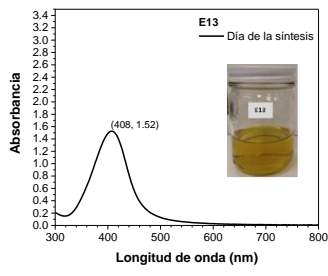
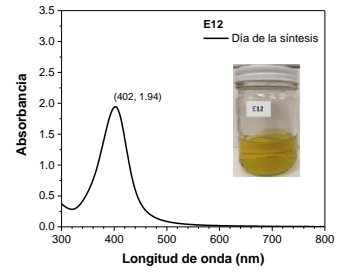
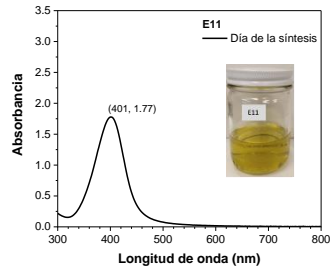
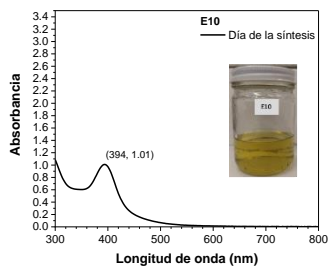
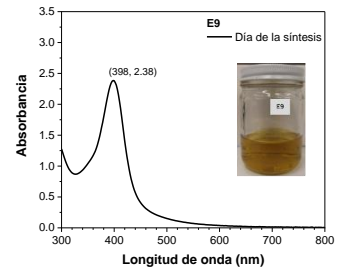
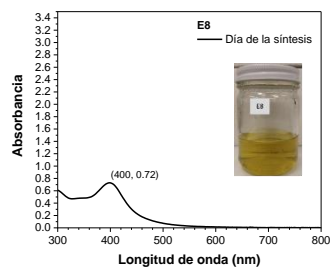
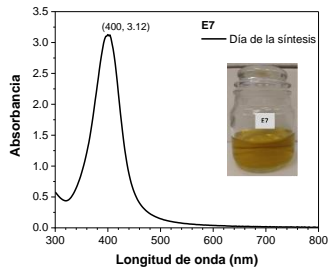
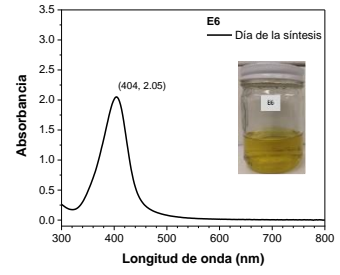
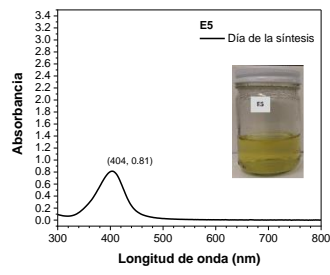
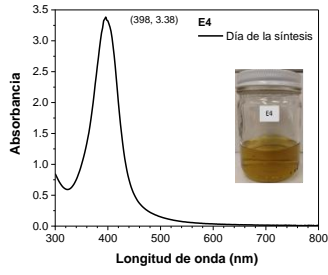
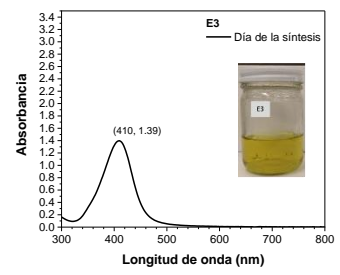
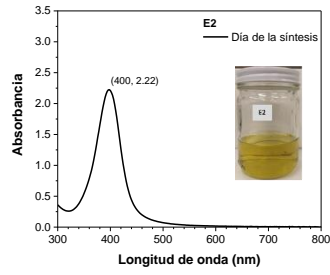
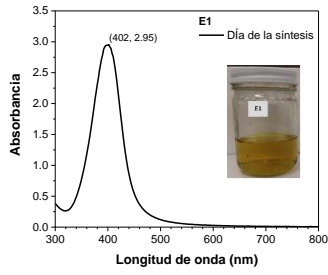
En la figura 30 se presenta una fotografía de los 29 experimentos sugeridos por el diseño experimental de la MSR (ver la configuración de cada uno en la tabla 8 de la sección 4.3 de detalles experimentales), a la hora de ser preparados. Todos presentaron un cambio de coloración a amarillo o ámbar, y en algunos fue más intenso que en otros. Dicho color se puede relacionar con las diferencias en las características y concentraciones de las AgNPs formadas en cada experimento (Chhatre, A., *et al.*, 2012).

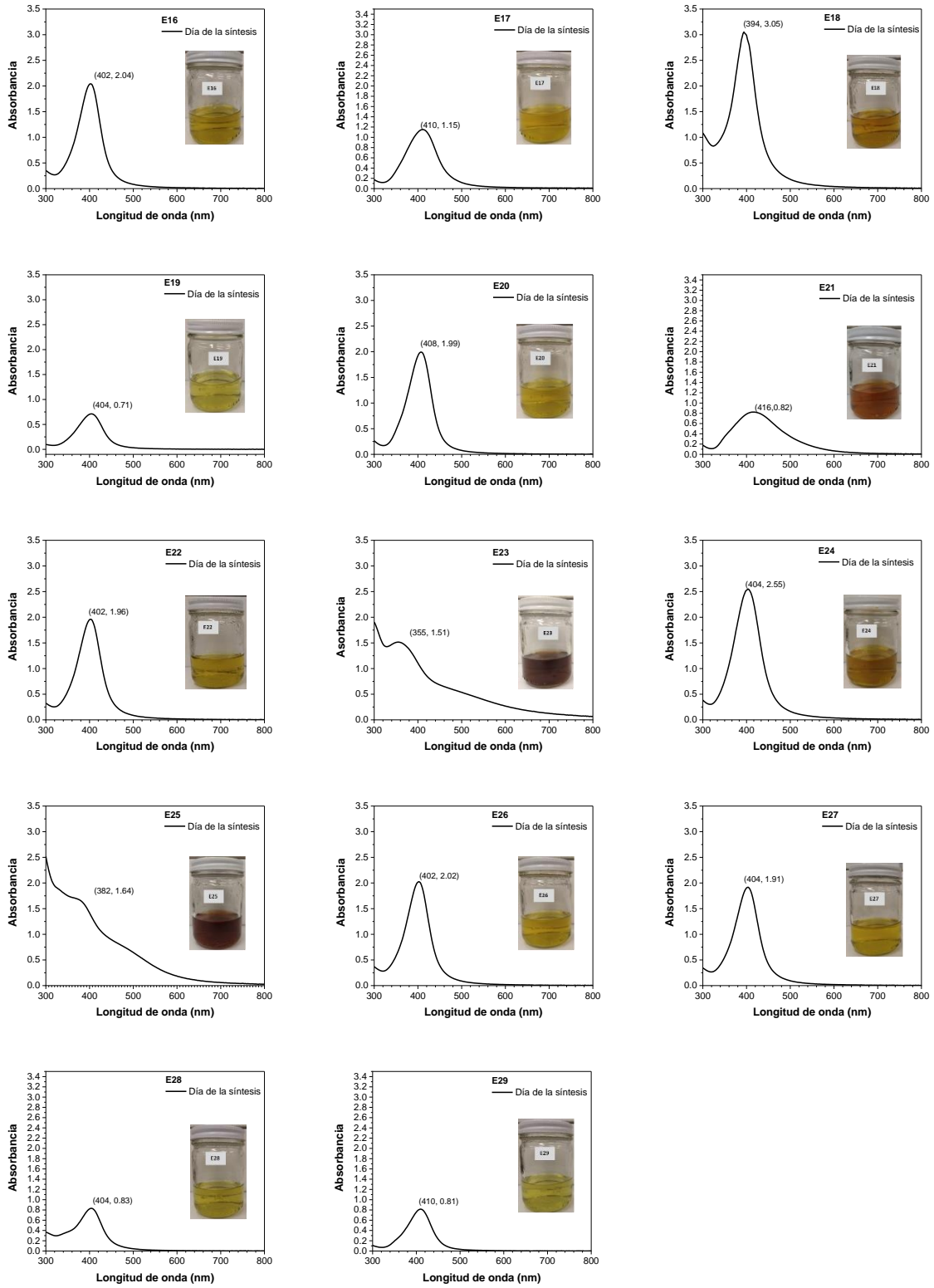


**Figura 30.** Fotografía de los 29 experimentos sugeridos por el diseño Box-Benhken.

En la figura 31 se puede confirmar la presencia de AgNPs en los 29 experimentos a la hora de su preparación, debido a que todos presentan un pico de absorbancia alrededor de 400 nm. La diferencia en la intensidad, ancho y ubicación de los picos se puede asociar con diferencias en la concentración, en el tamaño y estado de agregación de las AgNPs (García, 2011), la cual es consecuencia de los distintos valores de cada uno de los factores considerados.

En la columna siete de la tabla 10 se incluyen las absorbancias máximas de las AgNPs de cada experimento, que son los valores de respuesta para cada uno de ellos. Mientras que en la columna 8 de la misma tabla se agregan las absorbancias máximas predichas por el modelo de regresión polinomial ajustado, resultante del tratamiento estadístico de los datos. Si se comparan los valores predichos por el modelo con los reales se observa a *grosso modo* una buena correlación, la cual se verifica detalladamente más adelante. Es decir, es cercano el valor predicho de la máxima absorbancia por el modelo, con la absorbancia obtenida con el espectrofotómetro, parámetro nombrado en la columna 7 como valor real.





**Figura 31.** Absorbancia UV-Vis de las AgNPs sintetizadas en los 29 experimentos efectuados el día de su preparación.

**Tabla 10.** Diseño Box-Benhken de la superficie de respuesta y resultados de los experimentos realizados.

Experimento	Punto	A	B	C	D	Absorbancias máximas centradas alrededor de 400 nm	
						Valor real	Valor predicho
1		1	0.200	11	61.5	2.954	2.802
2		1	0.125	11	100	2.225	2.090
3		1	0.125	10	61.5	1.398	1.312
<b>4</b>		<b>5</b>	<b>0.200</b>	<b>11</b>	<b>100</b>	<b>3.384</b>	2.952
5		1	0.050	11	61.5	0.814	0.908
6		1	0.125	12	61.5	2.052	1.800
7		9	0.200	11	61.5	3.128	2.829
8		5	0.050	12	61.5	0.729	0.507
9		9	0.125	11	100	2.385	2.114
10		5	0.050	11	100	1.01	0.994
11		1	0.125	11	23	1.778	1.864
12	Central	5	0.125	11	61.5	1.943	1.987
13		5	0.125	10	23	1.526	1.230
14		9	0.125	11	23	1.542	1.886
15		5	0.125	12	23	1.798	1.705
16	Central	5	0.125	11	61.5	2.042	1.987
17		5	0.200	10	61.5	1.151	1.529
18		5	0.200	12	61.5	3.053	3.222
<b>19</b>		<b>5</b>	<b>0.050</b>	<b>11</b>	<b>23</b>	<b>0.711</b>	0.840
20		9	0.125	10	61.5	1.993	1.330
21		5	0.125	10	100	0.824	1.415
22	Central	5	0.125	11	61.5	1.961	1.987
23		9	0.125	12	61.5	1.516	1.822
24		5	0.200	11	23	2.551	2.682
25		5	0.125	12	100	1.654	1.921
26	Central	5	0.125	11	61.5	2.026	1.987
27	Central	5	0.125	11	61.5	1.917	1.987
28		9	0.050	11	61.5	0.832	0.924
29		5	0.050	10	61.5	0.816	0.771

A: Concentración de *inulina de agave* (mg/mL), B: concentración de AgNO<sub>3</sub> (mM), C: pH y D: temperatura (°C).

Para evaluar la calidad del modelo de regresión polinomial ajustado se efectúa un análisis de varianza (ANOVA). La idea central del ANOVA es comparar la variación debida al tratamiento (cambio en la combinación de los niveles de los factores) con la variación debida a los errores aleatorios inherentes a las mediciones de las respuestas generadas (Bezerra, *et al.*, 2008). De esta manera, en el ANOVA se desea que el tipo de modelo ya sea lineal, cuadrático, etc. sea significativo. Así mismo deben de ser cada uno de los términos del

modelo que se corresponden con los factores experimentales considerados y todas sus posibles interacciones. Además, para comprobar la adecuación del modelo es útil el coeficiente de determinación  $R^2$ . Este coeficiente es una medida de la cantidad de reducción de la variabilidad de los datos experimentales y los predichos por el modelo ajustado, así que indica la correlación entre ambos conjuntos de datos. Un valor de  $R^2$  cercano a 1 en ocasiones puede significar una buena correlación, pero en otras, puede producir predicciones deficientes, ya que  $R^2$  siempre aumenta a medida que aumentan los términos del modelo sean o no significativos. Sin embargo, haciendo un ajuste a  $R^2$  se obtiene el estadístico “ $R^2$  ajustado” el cual es menos sensible al incremento de los términos del modelo (Myers & Anderson, 2016). Si  $R^2$  y “ $R^2$  ajustado” no difieren significativamente se corrobora la significancia del modelo. Conjuntamente, el estadístico “ $R^2$  pronosticado” es otro valor que indica qué tan bien un modelo de regresión predice respuestas para nuevas observaciones, y si el valor de “ $R^2$  pronosticado” está razonablemente de acuerdo con el valor de “ $R^2$  ajustado” se fortalece la significancia del modelo.

En la tabla 11 se muestra un primer análisis de varianza (ANOVA) realizado a los datos experimentales con el software Design-Expert 7.0.0. En ella se puede notar que el modelo cuadrático es significativo, ya que exhibe un “P valor” menor a 0.0001 el cual es inferior a 0.05. Sin embargo, se puede constatar que los únicos factores e interacción entre factores significativos del modelo son: B, C, BC y  $C^2$ , ya que son los únicos que sus “P valores” son inferiores a 0.05. Por lo contrario, AB, AC, AD, BD y CD no son significativos, lo cual indica que la interacción entre cada par de estos factores no tiene mayor efecto en la variable de respuesta, que es la absorbancia máxima, la cual se relaciona directamente con la concentración de AgNPs formadas. Hay que recordar que A representa la concentración de *inulina de agave*, B la concentración del  $\text{AgNO}_3$ , C el pH y D la temperatura.

También, en la tabla 11 se encuentra que el “F-valor” de “falta de ajuste” es de 60.96 lo cual implica que es significativo y se requiere ajustar el modelo. Una falta significativa de ajuste no es buena, ya que se desea que el modelo se ajuste. Por otra parte, el valor de “ $R^2$  pronosticado” de 0.4517 no está tan cerca del valor de “ $R^2$  ajustado” de 0.8087 como cabría esperar normalmente. Esto puede indicar un posible problema con el modelo y/o datos. Así que se debe considerar la reducción del modelo, la transformación de la respuesta, los valores atípicos, etc. El valor “Precisión adecuada” mide la relación señal/ruido y es deseable una

relación superior a 4. Así que la relación de 11.872 indica una señal adecuada. Aunque este modelo se podría utilizar para navegar por el espacio de diseño, más adelante se hace una mejor adecuación reduciendo los términos del modelo y transformando la variable de respuesta.

**Tabla 11.** Análisis de varianza (ANOVA) para el primer ajuste del modelo cuadrático del diseño Box-Benhken.

Fuente	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F valor	P valor Prob>F	Estado
Modelo	2.13	14	0.15	9.45	< 0.0001	significativo
A-inulina	2.002E-004	1	2.002E-004	0.012	0.9127	
B-AgNO <sub>3</sub>	1.56	1	1.56	96.92	< 0.0001	
C-pH	0.12	1	0.12	7.20	0.0178	
D-Temperatura	0.019	1	0.019	1.21	0.2905	
AB	3.995E-004	1	3.995E-004	0.025	0.8770	
AC	0.046	1	0.046	2.88	0.1117	
AD	5.209E-003	1	5.209E-003	0.32	0.5783	
BC	0.13	1	0.13	8.15	0.0127	
BD	1.624E-003	1	1.624E-003	0.10	0.7553	
CD	0.019	1	0.019	1.16	0.3004	
A <sup>2</sup>	7.839E-003	1	7.839E-003	0.49	0.4965	
B <sup>2</sup>	0.054	1	0.054	3.35	0.0887	
C <sup>2</sup>	0.17	1	0.17	10.45	0.0060	
D <sup>2</sup>	5.197E-003	1	5.197E-003	0.32	0.5787	
Residual	0.23	14	0.016			
Falta de ajuste	0.22	10	0.022	60.96	0.0006	significativo
Error puro	1.468E-003	4	3.669E-004			
R <sup>2</sup>	0.9043					
R <sup>2</sup> ajustado	0.8087					
R <sup>2</sup> pronosticado	0.4517					
Precisión adecuada	11.872					

El resultado de un nuevo ANOVA efectuado al modelo ajustado que resultó de eliminar algunos de los términos menos significativos y una transformación a la variable de respuesta se muestra en la tabla 12. En el nuevo modelo de regresión solo se incluyeron los términos A, B, C, D, BC, B<sup>2</sup> y C<sup>2</sup>. En él, los valores de R<sup>2</sup> = 0.8669, R<sup>2</sup> ajustado = 0.8225 y R<sup>2</sup> pronosticado = 0.6815 no difieren significativamente, lo cual indica que el modelo es más adecuado. Por otra parte, el valor de "Precisión adecuada" de 16.876, evidentemente mayor a 4, indica una señal adecuada. Con esto se concluye que el modelo será apropiado para navegar por el espacio del diseño.



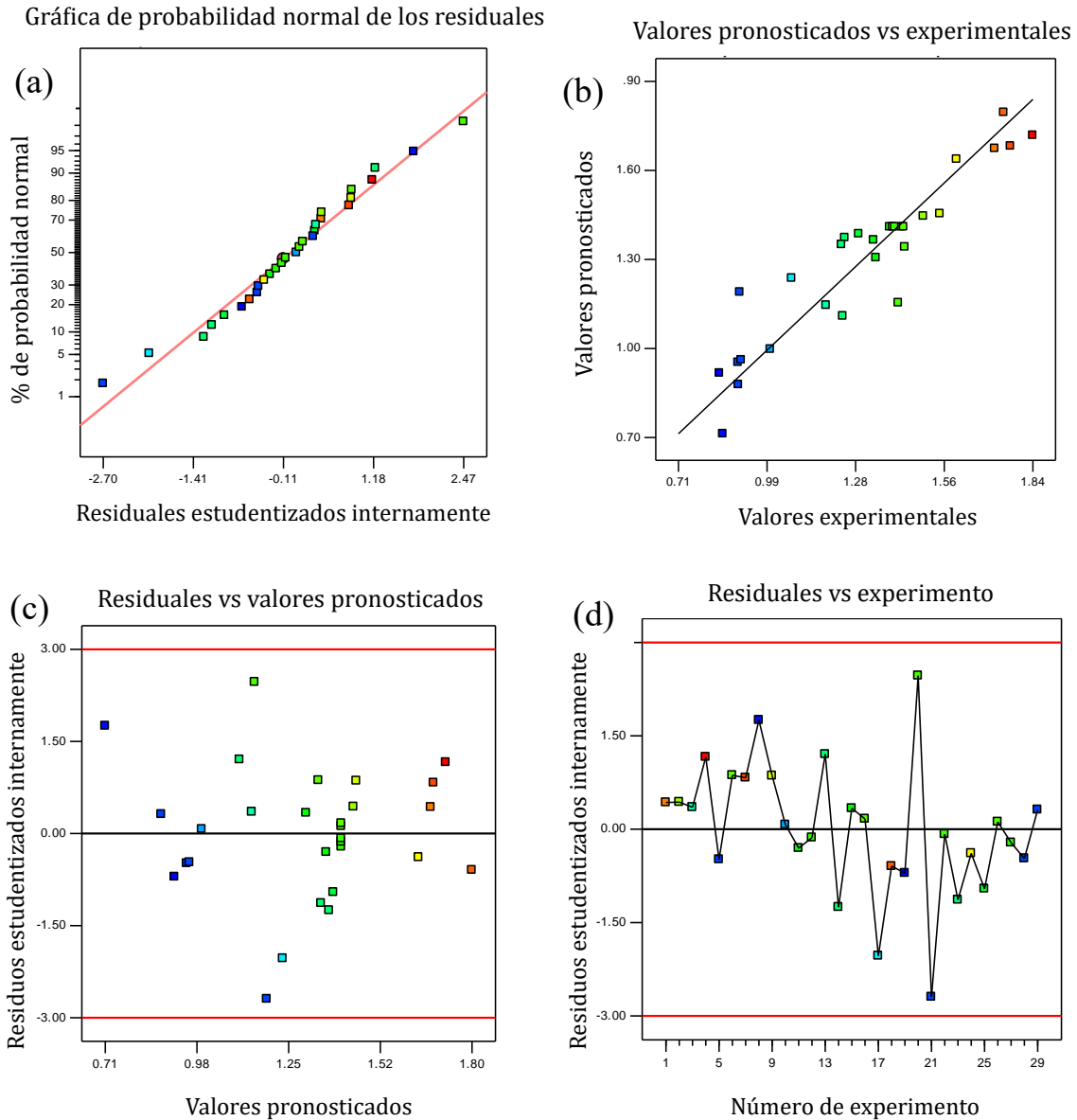
**Tabla 12.** Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo mejorado del diseño Box-Benhken.

Fuente	Suma de cuadrados	df	Cuadrado medio	F valor	P valor Prob>F	Estado
Modelo	2.04	7	0.29	19.53	< 0.0001	Significativo
A-inulina	2.002E-004	1	2.002E-004	0.013	0.9089	
B-AgNO <sub>3</sub>	1.56	1	1.56	104.45	< 0.0001	
C-pH	0.12	1	0.12	7.76	0.0111	
D-Temperatura	0.019	1	0.019	1.30	0.2669	
BC	0.13	1	0.13	8.78	0.0074	
B <sup>2</sup>	0.059	1	0.059	3.92	0.0608	
C <sup>2</sup>	0.18	1	0.18	12.13	0.0022	
Residual	0.31	21	0.015			
Falta de ajuste	0.31	17	0.018	50.00	0.0009	Significativo
Error puro	1.468E-003	4	3.669E-004	1.468E-003		
R <sup>2</sup>	0.8669					
R <sup>2</sup> ajustado	0.8225					
R <sup>2</sup> pronosticado	0.6815					
Precisión adecuada	16.876					

Para la validación de un modelo se debe tener en cuenta que la mayor parte de las variaciones en las observaciones deben ser descritas por el modelo de regresión y el resto de las variaciones se atribuyen a los residuos. Así que una acción complementaria para la evaluación de la precisión del modelo es el análisis de los gráficos de los residuales. Si un modelo está bien ajustado la gráfica de los residuales mostrará un comportamiento que sugiere una distribución normal (Bezerra, et al., 2008). Para deducir la distribución normal de los residuales se hace su gráfica de probabilidad normal, si resulta aproximadamente lineal se supone que los términos del error se distribuyen normalmente (Myers & Anderson, 2016). En la figura 32(a) se muestra la gráfica de probabilidad normal de los residuos en nuestro modelo, donde se puede observar que todos los datos están muy cerca de la línea recta, lo que confirma la normalidad de los residuales y reafirma el buen ajuste del modelo.

En la figura 32(b) se presenta una gráfica de los valores de respuesta experimentales frente a los valores pronosticados por el modelo, en la cual se puede notar que existe una fuerte y favorable correlación entre ambos valores. En la figura 32(c) se muestra la gráfica de los residuales frente a los valores pronosticados por el modelo donde se evidencia que hay una dispersión semejante entre los datos residuales por encima y por debajo del eje horizontal, muestra de la aleatoriedad entre residuos positivos y negativos y de su varianza

constante. Adicionalmente, en la figura 32(d) se muestra la dispersión aleatoria de residuos a lo largo de su valor medio, lo que indica que son independientes del orden de ejecución.

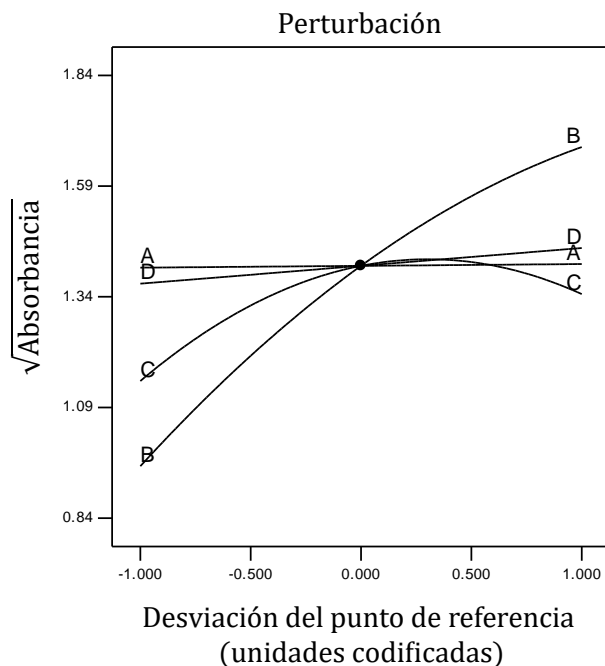


**Figura 32.** Gráfica de (a) probabilidad normal de los residuales, (b) valores de respuesta experimentales vs valores pronosticados, (c) valores pronosticados vs residuales y (d) corridas vs residuales.

Finalmente, el modelo de regresión obtenido que expresa la relación funcional entre los parámetros experimentales seleccionados y la variable de respuesta (absorbancia máxima) se escribe en la ecuación 14.

$$\sqrt{y} = -16.87536 + 0.00102 * A - 17.64581 * B + 3.35967 * C + 0.00104 * D + 2.41316 * B * C - 16.37588 * B^2 - 0.16196 * C^2. \quad (14)$$

Con este modelo de regresión se concluye que los factores que más influyen en la absorbancia máxima son B y C, es decir, la concentración del AgNO<sub>3</sub> y el pH, ya que los valores absolutos de sus coeficientes son mayores. Mientras que los que menos influyen son el A y D, concentración de *inulina de agave* y temperatura, respectivamente, debido a que los valores de sus coeficientes son muy pequeños. Además, los términos de A, C, D y BC tienen un efecto sinérgico sobre la absorbancia máxima por ser positivos, mientras los de los factores B, B<sup>2</sup> y C<sup>2</sup> tienen un efecto antagónico por ser negativos (Chowdhury, et al., 2016). En concordancia, en la figura 33 se muestra la gráfica de perturbación de los cuatro factores experimentales. Para los diseños de superficie de respuesta, la gráfica de perturbación muestra cómo cambia la respuesta a medida que cada factor se mueve desde el punto de referencia elegido, con todos los demás factores mantenidos constantes en el valor de referencia (Krupa, et al., 2016). En este caso, teniendo al punto central (A=5 mg/mL, B=0.125 mM, C=11 y D=61.5 °C) como punto de referencia, los factores A y D no muestran efectos significativos en la absorbancia máxima, mientras B y C si lo hacen, pero el factor B tiene un efecto mayor al del factor C.

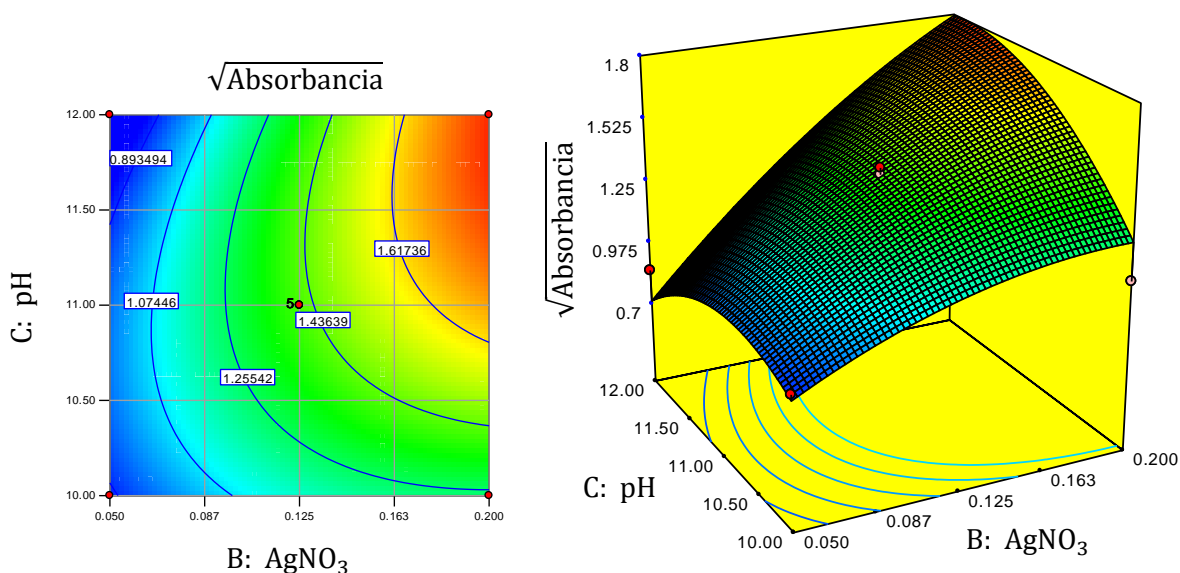


**Figura 33.** Gráfica de perturbación de los factores concentración de *inulina de agave* (A), concentración del AgNO<sub>3</sub> (B), pH (C) y temperatura (D).

De la ecuación 14 se sabe que la única interacción significativa entre factores es la que ocurre entre B y C, es decir, entre la concentración del AgNO<sub>3</sub> y el pH, ya que es el único término del modelo que incluye el producto de dos o más factores. Por esta razón, en la figura 34 se presenta la gráfica de contornos y de superficie de respuesta de la absorbancia máxima en función de dichos factores, donde los otros factores A y D (*inulina de agave* y temperatura) se mantuvieron constantes en sus puntos centrales, a 5 mg/mL y 61.5 °C, respectivamente. En esta figura se puede notar que con el incremento de la concentración del AgNO<sub>3</sub> incrementa la absorbancia, mientras que parece que para pH entre 11 y 12 ocurre la máxima absorbancia. De acuerdo con estos resultados parece ser conveniente mover la región experimental para valores mayores del AgNO<sub>3</sub> y pH.

Sin embargo, al incrementar los valores de AgNO<sub>3</sub> con los correspondientes valores del pH las absorbancias máximas superarían el límite de medición del espectrofotómetro, como ocurrió en los experimentos usando el método tradicional, dificultando el proceso para tener conocimiento del valor del centro de absorción, debido a que se tendría que hacer una serie de diluciones y estimaciones de las absorbancias máximas.

No obstante, tomando en cuenta los valores de la tabla 10 se encuentra que la absorbancia máxima real más alta fue de 3.384 (casi alcanzando la medida máxima que el espectrofotómetro UV-Vis puede mostrar), la cual corresponde al experimento 4, donde la muestra fue preparada con 5 mg/mL de *inulina de agave*, 0.2 mM de  $\text{AgNO}_3$ , pH=11 y a  $100^\circ\text{C}$ . Por el contrario, la absorbancia real más baja fue de 0.711 ocurrida en el experimento 19 utilizando en su síntesis 5 mg/mL de *inulina de agave*, 0.05 mM de  $\text{AgNO}_3$ , pH=11 y temperatura de  $23^\circ\text{C}$ .



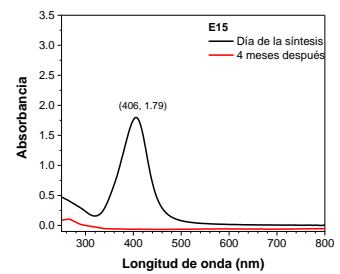
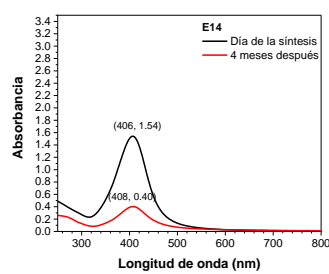
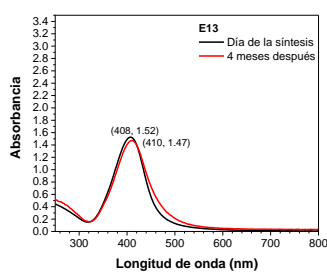
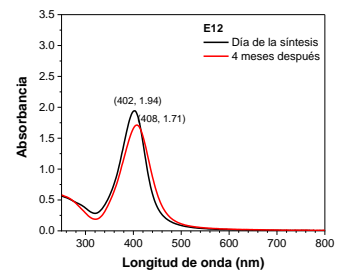
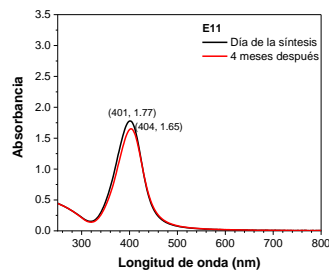
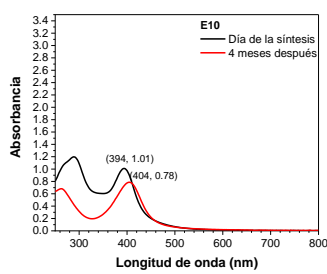
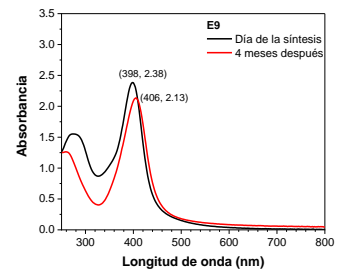
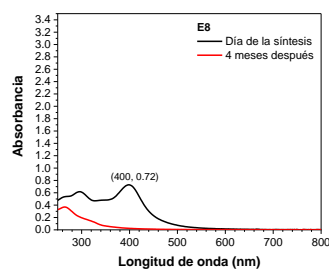
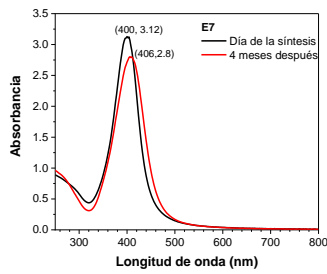
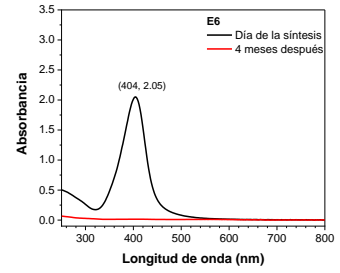
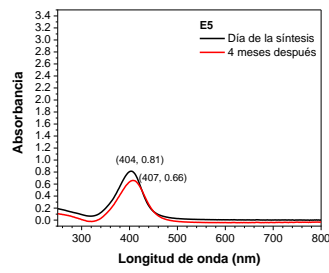
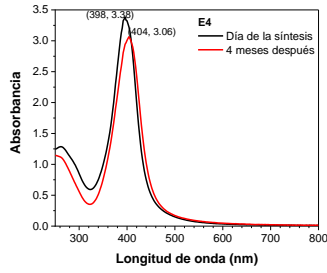
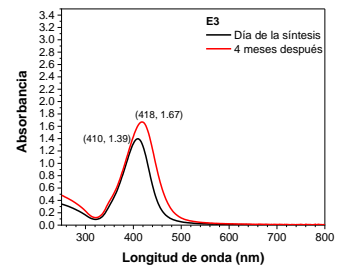
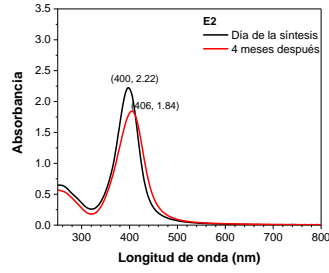
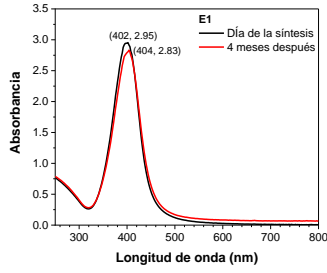
**Figura 34.** (a) Gráfica de contornos y (b) Gráfica de superficie de respuesta de la concentración del  $\text{AgNO}_3$  (B) y el pH (C) sobre la absorbancia de las AgNPs. Para estas gráficas los factores *inulina de agave* y temperatura se mantuvieron constantes a 5 mg/mL y  $61.5^\circ\text{C}$  respectivamente.

Adicionalmente, para conocer los cambios ocurridos en las AgNPs de los 29 experimentos, incluyendo su estabilidad, en la tabla 13 se presenta el dato de la máxima absorbancia del primer día y al cuarto mes de la síntesis, y en la figura 35 las absorbancias de la segunda medición. En ambas representaciones se puede notar que, solo en tres experimentos (3, 17 y 21) la absorbancia aumenta, aunque también su máximo está desplazado a una longitud de onda más larga, donde coincidentemente los tres se prepararon con el menor pH, que fue de 10. Esto indica que después del día de la preparación hubo un incremento en la concentración y en el tamaño de las AgNPs. Mientras tanto, en el resto de los experimentos las absorbancias decrecen, aunque en la mayoría de los casos fue poca su disminución. A excepción de los experimentos 6, 8, 15, 23 y 25, ya que no aparece el pico de

absorción. Esto se debe a que en la base de los frascos a simple vista se observó sedimento, lo cual indica una aglomeración de nanopartículas suficiente para precipitar. Además, se pueden notar que todas las que sedimentaron se prepararon con pH=12, lo que significa que pronto se completó la síntesis de las AgNPs y su estabilidad fue menor a 4 meses.

**Tabla 13.** Comparativo de absorbancias de los experimentos del día de la síntesis y 4 meses después.

Experimento	A	B	C	D	$\lambda_{m\acute{a}x}$	Absorbancia Máxima día de síntesis	$\lambda_{m\acute{a}x}$	Absorbancia Máxima 4 meses después	Observación
1	1	0.2	11	61.5	402	2.954	404	2.83	disminuyó
2	1	0.125	11	100	400	2.225	406	1.84	disminuyó
3	1	0.125	10	61.5	410	1.398	418	1.67	aumentó
4	5	0.2	11	100	398	3.384	405	3.06	disminuyó
5	1	0.05	11	61.5	404	0.814	407	0.66	disminuyó
6	1	0.125	12	61.5	404	2.052	-	0	disminuyó
7	9	0.2	11	61.5	400	3.128	406	2.8	disminuyó
8	5	0.05	12	61.5	400	0.729	-	0	disminuyó
9	9	0.125	11	100	398	2.385	406	2.13	disminuyó
10	5	0.05	11	100	394	1.01	404	0.78	disminuyó
11	1	0.125	11	23	401	1.778	404	1.65	disminuyó
12	5	0.125	11	61.5	402	1.943	408	1.71	disminuyó
13	5	0.125	10	23	408	1.526	410	1.47	disminuyó
14	9	0.125	11	23	406	1.542	408	0.4	disminuyó
15	5	0.125	12	23	406	1.798	-	0	disminuyó
16	5	0.125	11	61.5	402	2.042	406	1.84	disminuyó
17	5	0.2	10	61.5	410	1.151	414	1.64	aumentó
18	5	0.2	12	61.5	394	3.053	404	2.47	disminuyó
19	5	0.05	11	23	404	0.711	406	0.58	disminuyó
20	9	0.125	10	61.5	408	1.993	410	1.86	disminuyó
21	5	0.125	10	100	416	0.824	418	1.18	aumentó
22	5	0.125	11	61.5	402	1.961	405	1.57	disminuyó
23	9	0.125	12	61.5	355	1.516	-	0	disminuyó
24	5	0.2	11	23	404	2.551	408	2.25	disminuyó
25	5	0.125	12	100	380	1.654	-	0	disminuyó
26	5	0.125	11	61.5	402	2.026	406	1.63	disminuyó
27	5	0.125	11	61.5	404	1.917	406	1.57	disminuyó
28	9	0.05	11	61.5	404	0.832	407	0.71	disminuyó
29	5	0.05	10	61.5	410	0.816	414	0.71	disminuyó



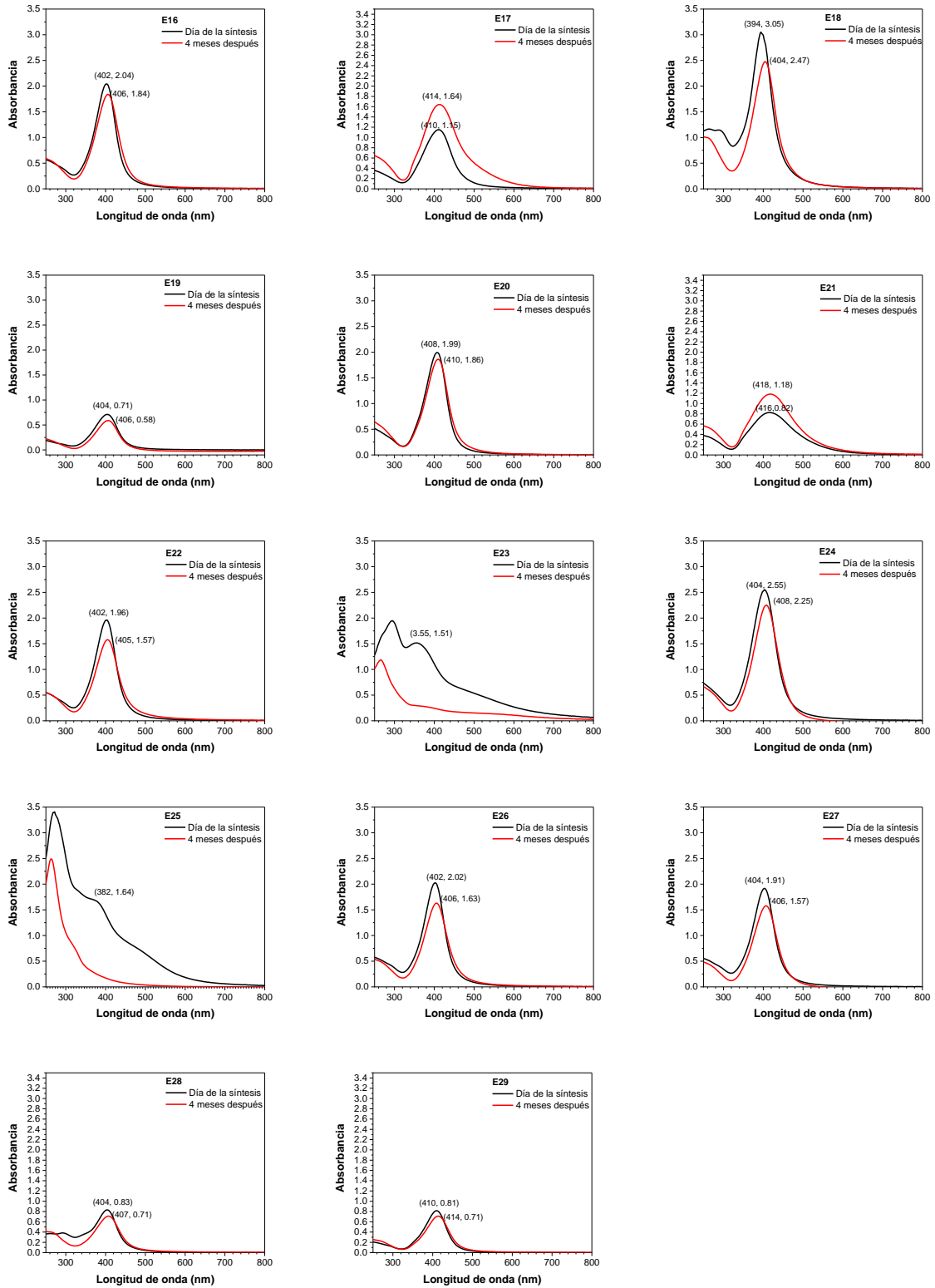
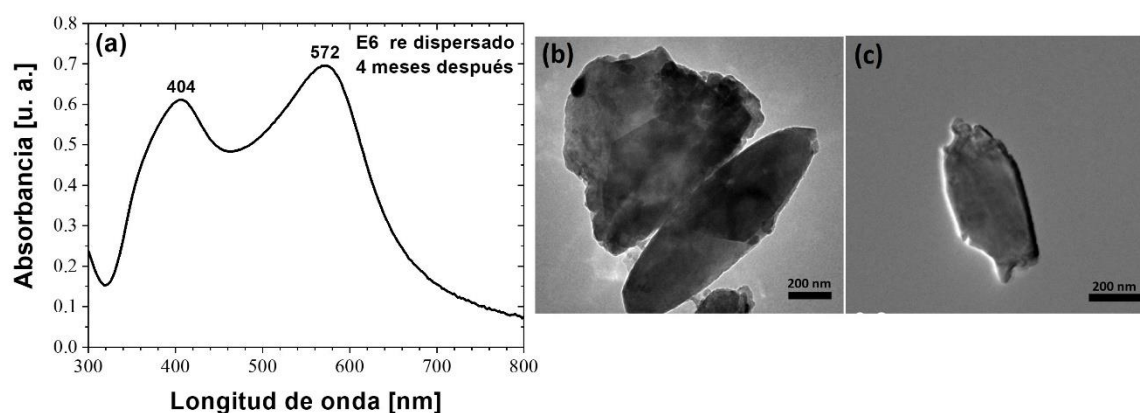


Figura 35. Absorbancia UV-Vis de los 29 experimentos, del día de la síntesis y 4 meses después.



Particularmente, el experimento 6, que fue uno de los que sedimentaron por completo, al cuarto mes presentó una coloración morado uva, motivo por el que se re dispersó y se analizó nuevamente con el espectrofotómetro UV-Vis. Un hecho interesante fue observado en la figura 36a, donde se puede notar que han aparecido dos picos de absorción centrados en 404 y 572 nm, donde el pico centrado en 572 nm se debe a la resonancia del plasmón longitudinal, la cual se suele atribuir a la parte elongada del nanomaterial. En otras palabras, podría indicar la presencia de nanopartículas de diferente geometría a la cuasi esférica. Sin embargo, la amplitud de los picos, al ser corta se puede atribuir a la presencia de muy poco nanomaterial. Incluso, si se compara la figura 36a con la del mismo experimento de la figura 31, que fue medido a la hora de ser preparado, se puede notar que el pico centrado en 404 permanece, pero del día de la síntesis a 4 meses después, baja de 2.05 a 0.6, indicativo de disminución drástica de la cantidad de AgNPs en suspensión líquida.

Para conocer con certeza la geometría de las AgNPs del experimento, fueron caracterizadas con el MET. En las figuras 36a y 36b se muestran dos micrografías las cuales evidencian la aglomeración de las nanopartículas, en las que además se puede notar ciertas elongaciones que probablemente son los que originaron el pico centrado en 572 de la figura 36a.



**Figura 36.** Absorbancia UV-Vis del experimento 6, cuatro meses después de su preparación.

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES

La *inulina de agave* es un compuesto biológico efectivo para producir AgNPs cuasi esféricas de tamaño muy pequeño, menor de 10 nm. Además, la síntesis se consigue mediante un proceso sencillo, económico y amigable con el medio ambiente. En la producción de las AgNPs influyen los factores experimentales, como; concentración de *inulina de agave*, concentración de  $\text{AgNO}_3$ , temperatura y pH. No obstante, el pH es el factor más significativo en acelerar la producción de AgNPs.

Con el aumento en la concentración de *inulina de agave* se da una mayor producción de AgNPs debido a que participan más moléculas reductoras del azúcar del agave. Sin embargo, si se hace a temperatura ambiente y pH neutro, la hidrólisis de la inulina es lenta y por consiguiente la producción de AgNPs también lo es. Por su parte, también aumenta la producción de AgNPs con el incremento de la concentración de  $\text{AgNO}_3$ , lo cual se debe a que participan más átomos de plata. En el caso de la temperatura, se encontró que a una temperatura mayor de  $60^\circ\text{C}$  se incrementa notablemente la tasa de formación de nanopartículas.

Sin embargo, el aumento del pH acelera drásticamente la tasa de formación de las AgNPs, incluso de manera predominante sobre el parámetro de la temperatura. Mientras que con pH neutro puede tardar incluso semanas en completarse la formación de AgNPs, con pH=12 se puede lograr en cuestión de minutos. Esto sucede, debido a que un incremento del pH lleva a un aumento en la velocidad de ruptura de los enlaces glucosídicos que unen las unidades de fructosa que componen la *inulina*, lo que genera un rápido aumento de moléculas reductoras que ceden electrones a los iones  $\text{Ag}^+$  que son reducidos a  $\text{Ag}^0$ , y en consecuencia se forman rápidamente las AgNPs. Además, con una mayor cantidad de moléculas reductoras se aprovechan al máximo los iones  $\text{Ag}^+$  disponibles para ser reducidos y se forma la mayor cantidad posible de nanopartículas.

Asimismo, como se puede constatar en las figuras 18, 19, 20 y 22 al incrementar los valores de los cuatro factores experimentales, se da un corrimiento de los picos de absorción a longitudes de onda menores, que se relaciona con una ligera disminución en los tamaños de las nanopartículas. Esto significa que, el incremento de los factores experimentales, unos en mayor medida que otros, acelera la tasa de formación y a la vez favorece la formación de nanopartículas de tamaños más pequeños. Más aún, es posible obtener distribuciones de tamaño más estrechas. Es decir, si se comparan las figuras 21, 24, 25 y 26 se puede notar que las AgNPs obtenidas con pH=12 (el factor predominante) son las que presentan una distribución de tamaño más angosta.

Por otra parte, se confirmó que con una alta concentración de AgNPs se tiene un efecto favorable contra la bacteria *E. coli*. Con las condiciones experimentales de: 60 mg/mL de *inulina de agave*, 10 mM de AgNO<sub>3</sub>, a 23°C y pH=12 se formó la más alta concentración de AgNPs, mismas que manifestaron exitosamente efecto contra la bacteria. De acuerdo con consideraciones teóricas explicadas en la sección 5.2 de resultados y discusión, la concentración de estas nanopartículas fue de alrededor de  $2 \times 10^{14}$  nanopartículas/mL. Además, el tamaño promedio de partícula fue de 8.71 nm (ver figura 26) lo cual concuerda con la información de la literatura científica porque las AgNPs que causan efecto bactericida son de alrededor de 10 nm.

Mediante la Metodología de Superficie de Respuesta se confirmaron los resultados del método tradicional explicado en los párrafos anteriores sobre el efecto de cada uno de los factores experimentales en la producción de las AgNPs. También se obtuvo que el efecto predominante para la producción de las AgNPs fue el pH. Además, que la única interacción significativa entre los factores es entre el pH y la concentración del AgNO<sub>3</sub>. Es decir, con pH=12 la tasa de formación de AgNPs aumentará drásticamente al incrementar la concentración de AgNO<sub>3</sub>.

Ambos métodos son buenos para realizar una optimización en la producción de este nanomaterial. Por su parte, el método tradicional ha sido ampliamente explorado, mientras que el de la Metodología de Superficie de Respuesta es relativamente nuevo para la optimización en la síntesis de AgNPs. En nuestro caso, fue útil conocer los resultados del método tradicional para poder establecer el punto de partida y definir los factores

experimentales y sus valores. Una ventaja de la MSR sobre el método tradicional es que da información sobre la interacción de los factores experimentales, y, además en general se puede reducir la cantidad de experimentos a elaborar de una forma estratégica y eficiente, que conlleva una disminución de gastos y de tiempo para la optimización.

## REFERENCIAS

- About El-Nour, K. M., Eftaiha, A. A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 135-140.
- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Rsc Advances*, 4(8), 3974-3983.
- Ahmad, S., Munir, S., Zeb, N., Ullah, A., Khan, B., Ali, J., & Ali, S. (2019). Green nanotechnology: a review on green synthesis of silver nanoparticles - an ecofriendly approach. *International Journal of Nanomedicine*, 5087-5107.
- Ali, Z. A., Yahya, R., Sekaran, S. D. & Puteh, R. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using apple extract and its antibacterial properties. *Advances in Materials Science and Engineerin*, 2016.
- Alzahrani, E., & Welham, K. (2014). Optimization preparation of the biosynthesis of silver nanoparticles using watermelon and study of its antibacterial activity. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 392.
- Amirjani, A., Firouzi, F., & Haghshenas, D. F. (2020). Predicting the size of silver nanoparticles from their optical properties. *Plasmonics*, 15, 1077-1082.
- Amro, N. A., Kotra, L. P., Wadu-Mesthrige, K., Bulychev, A., Mobashery, S., & Liu, G. Y. (2000). High-resolution atomic force microscopy studies of the Escherichia coli outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir*, 16(6), 2789-2796.
- Arif, R., & Uddin, R. (2021). A review on recent developments in the biosynthesis of silver nanoparticles and its biomedical applications. *Medical Devices & Sensors*, 4(1), e10158.
- Arole, V. M., & Munde, S. V. (2014). Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up approaches-an overview. *Journal of Material Science*, 1, 89-93.
- Autino, J. C., Romanelli, G. P., & Ruiz, D. M. (2013). Introducción a la química orgánica. *Series: Libros de Cátedra*.

- Ayala, N. N. V., Lara, V. H. H., del Carmen, I. T. L., & Rodríguez, P. C. (2009). Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*, 5(1), 2-9.
- Azmi, S. N. H., Al-Jassasi, B. M. H., Al-Sawafi, H. M. S., Al-Shukaili, S. H. G., Rahman, N., & Nasir, M. (2021). Optimization for synthesis of silver nanoparticles through response surface methodology using leaf extract of *Boswellia sacra* and its application in antimicrobial activity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(8), 1-16.
- Balamurugan, M. & Saravanan, S. (2017). Green Synthesis of Silver Nanoparticles by using *Eucalyptus Globulus* Leaf Extract. *Journal of the Institution of Engineers (India): Series A*, 98(4), 461-467.
- Bar, H., Bhui, D. K., Sahoo, G. P., Sarkar, P., De, S. P., & Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 339(1-3), 134-139.
- Barabadi, H. (2017). Nanobiotechnology: A promising scope of gold biotechnology. *Cellular and Molecular Biology*, 63(12), 3-4.
- Barabadi, H., Honary, S., Ebrahimi, P., Alizadeh, A., Naghibi, F., & Saravanan, M. (2019). Optimization of myco-synthesized silver nanoparticles by response surface methodology employing Box-Behnken design. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 49(2), 33-43.
- Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Cooper, P., & Petrovsky, N. (2016). Inulin - a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(3), 1132.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bhowmik, S., Das, T., Ghosh, S., Sharma, B. K., Majumdar, S., & De, U. C. (2018). Synthesis of Some New Chrysin Derivatives and Their Biological Assessment as Antibacterial, Antibiofilm and Antifungal Agent. *Asian Journal of Chemistry*, 30(3).  
<https://doi.org/10.14233/ajchem.2018.21167>

- Biswas, P. K., & Dey, S. (2015). Effects and applications of silver nanoparticles in different fields. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(8), 5880-5883.
- Calvo, O. D. A. (2017). *Evaluación del efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata sintetizadas por Paecilomyces varotii* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Querétaro, Qro.
- Cardoso P. (2016). Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Revista pediátrica del Hospital de Niños de Buenos Aires*, 58(260), 19-28.
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnology Progress*, 22(2), 577-583.
- Chernousova, Svitlana, and Matthias Epple. (2013). Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angewandte Chemie - International Edition* 52 (6): 1636–53. <https://doi.org/10.1002/anie.201205923>.
- Chhatre, A., Solasa, P., Sakle, S., Thaokar, R., & Mehra, A. (2012). Color and surface plasmon effects in nanoparticle systems: Case of silver nanoparticles prepared by microemulsion route. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 404, 83-92.
- Chowdhury, S., Yusof, F., Faruck, M. O., & Sulaiman, N. (2016). Process optimization of silver nanoparticle synthesis using response surface methodology. *Procedia Engineering*, 148, 992-999.
- Dahoumane, S. A., Mechouet, M., Wijesekera, K., Filipe, C. D., Sicard, C., Bazyliniski, D. A., & Jeffryes, C. (2017). Algae-mediated biosynthesis of inorganic nanomaterials as a promising route in nanobiotechnology—a review. *Green Chemistry*, 19(3), 552-587.
- Das, C. A., Kumar, V. G., Dhas, T. S., Karthick, V., Govindaraju, K., Joselin, J. M., & Baalamurugan, J. (2020). Antibacterial activity of silver nanoparticles (biosynthesis): A short review on recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101593.

- David, L., Moldovan, B., Vulcu, A., Olenic, L., Perde-Schrepler, M., Fischer-Fodor, E., ... & Filip, G. A. (2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 767-777.
- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K. K., & Häse, C. C. (2002). Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2668-2670.
- Edison, T. J. I. & Sethuraman, M. G. (2012). Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochemistry*, 47(9), 1351-1357.
- Findley M. E. (1974). Modified one-at-a-time optimization. *Journal of the American Institute of Chemical Engineers*. 20(6):1154-1160
- Galindo, D., Andrade, I. C., Benítez, A. M., Rosas, G. G., Chávez-Chávez, A., Centeno, A. P., & Aranda, M. Á. S. (2014). Overlapping of laser pulses and its effect on the yield of silver nanoparticles in water. *Journal of Materials Science and Engineering B*, 4(10), 279-283. <https://doi.org/10.17265/2161-6221/2014.10.002>
- García, M. A. (2011). Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(28), 283001.
- Gardea, T. J. L., Gómez, E., Peralta, V. J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose, Y. M. (2003). Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357-1361.
- Gilmour, Steven G. (2006). Response Surface Designs for Experiments in Bioprocessing. *Biometrics*, 62(2), 323–331. doi:10.2307/3695851
- Gupta, N., Upadhyaya, C. P., Singh, A., Abd-Elsalam, K. A., & Prasad, R. (2018). Applications of silver nanoparticles in plant protection. *Nanobiotechnology applications in plant protection*, 247-265.
- Gupta, P., Bajpai, M., & Bajpai, S. K. (2008). Investigation of antibacterial properties of silver nanoparticle-loaded poly (acrylamide-co-itaconic acid)-grafted cotton fabric. *Journal of Cotton Science*. 12(3), 280-286.



- Hamouda, T., Myc, A., Donovan, B., Shih, A. Y., Reuter, J. D., & Baker, J. R. (2001). A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiological Research*, *156*(1), 1-7.
- Hemalatha, P., & Premnath, A. (2016). Study on silver nanoparticle encapsulated curcumin for anticancer activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, *5*, 953-958.
- Herrera, E., Álvarez, M. D. P. R., Salom, P. R., & Arribas, M. V. (2014). *Bioquímica básica*. Elsevier España SL.
- Hosnedlova, B., Kabanov, D., Kepinska, M., B Narayanan, V. H., Parikesit, A. A., Fernandez, C., ... & Kizek, R. (2022). Effect of Biosynthesized Silver Nanoparticles on Bacterial Biofilm Changes in *S. aureus* and *E. coli*. *Nanomaterials*, *12*(13), 2183.
- Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., ... & Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, *18*(10), 105104.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *9*(6), 385.
- Justo, M. B., Oropeza, L. G., Barboza-Corona, J. E., & Negrete, L. P. (2001). El Agave tequilana Weber y la producción de tequila. *Acta Universitaria*, *11*(2), 26-34.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J., & Srinivasan, K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus sinensis* peel extract and its antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *79*(3), 594-598.
- Khuri, A. I., & Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. Wiley *Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, *2*(2), 128-149.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., ... & Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *3*(1), 95-101.

- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., & Mohan, N. J. C. S. B. B. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 50-56.
- Krishnaraj, C., Ramachandran, R., Mohan, K., & Kalaichelvan, P. T. (2012). Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 93, 95-99.
- Kumar, H. A. K., Mandal, B. K., Kumar, K. M., babu Maddinedi, S., Kumar, T. S., Madhiyazhagan, P., & Ghosh, A. R. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of *Mimusops elengi* seed extract mediated isotropic silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, 13-18.
- Lai, Chin Yung, Choke Fei Cheong, Jit Singh Mandeep, Huda Binti Abdullah, Nowshad Amin, and Khin Wee Lai. (2014). "Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles and Silver Inks: Review on the Past and Recent Technology Roadmaps." *Journal of Materials Engineering and Performance* 23 (10): 3541–50. <https://doi.org/10.1007/s11665-014-1166-6>.
- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., & Zhang, Q. (2007). Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annum* L. extract. *Green Chemistry*, 9(8), 852-858.
- Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2012). Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International Journal of Nanomedicine*, 4263-4267.
- Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., & Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(6), 1465-1471.
- Ma L, Su W, Liu J, Zeng X., Huang Z, Li W, Tang J. X. (2017). Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions. *Materials Science and Engineering: C77*: 963-971. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.294>

- Maldonado, V. M., Guzmán, D., Camarena, P. D. A., Castellanos, A. A. P., Salinas, R. A., Garibo, D., ... & Bogdanchikova, N. (2021). Application of silver nanoparticles to reduce bacterial growth on leather for footwear manufacturing. *Journal of Applied Research and Technology*, *19*(1), 41-48.
- Marciniak L, Nowak M, Trojanowska A, Tylkowski B, Jastrzab R. (2020). The effect of pH on the size of silver nanoparticles obtained in the reduction reaction with citric and malic acids. *Materials*. *13*(23):1-12. doi: 10.3390/ma13235444
- Meshram, S. M., Bonde, S. R., Gupta, I. R., Gade, A. K., & Rai, M. K. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using white sugar. *IET Nanobiotechnology*, *7*(1), 28-32.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, *31*(2), 346-356.
- Morais, M. G. D., Martins, V. G., Steffens, D., Pranke, P., & da Costa, J. A. V. (2014). Biological applications of nanobiotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *14*(1), 1007-1017.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, *16*(10), 2346.
- Mortazavi, D. S., Yousefinia, A., Naghizadeh, A., Lashkari, S., & Hosseinzadeh, M. (2021). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Elaeagnus angustifolia* bark extract and study of Its antibacterial effect. *Journal of Polymers and the Environment*, *29*(11), 3539-3547.
- Nayak, R. R., Pradhan, N., Behera, D., Pradhan, K. M., Mishra, S., Sukla, L. B., & Mishra, B. K. (2011). Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: the process and optimization. *Journal of Nanoparticle Research*, *13*(8), 3129-3137. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-0208-8>
- Oroz, M. M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 33-41). Real Sociedad Española de Química.

- Oseguera G. D. O. (2012). *Estudio de condiciones físicas y químicas en la síntesis de nanopartículas de plata por ablación láser confinada en medios líquidos* (Tesis de Doctorado). Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco.
- Oseguera-Galindo D. O, Ocegüera-Contreras E, Pozas-Zepeda D. (2020). Silver nanoparticles synthesis using biomolecules of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as a reducing agent. *Journal of Nanophotonics*. 14(3): 036012-036012. <https://doi.org/10.1117/1.JNP.14.036012>
- Oseguera-Galindo, D. O, Martínez-Benitez, A, Chávez-Chavez, A, Gómez-Rosas, G, Pérez-Centeno, A, & Santana-Aranda, M. A. (2012). Effects of the confining solvent on the size distribution of silver NPs by laser ablation. *Journal of Nanoparticle Research*. 14(9), 1-6. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1133-9>
- Oseguera-Galindo, D. O., Valenzuela-López, M. T., Carrillo-Flores, A. M., Ocegüera-Contreras, E., & Negrete-Aragón, S. (2018). Theoretical considerations over the production of silver nanoparticles by laser ablation confined in distilled water. *Journal of Nanophotonics*, 12(4), 046007.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Al-Balakocy, N. G., Hassan, M. M., & Elshafei, A. M. (2021). Biosynthesized silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* NRRL265 for imparting durable antimicrobial finishing to polyester cotton blended fabrics: Statistical optimization, characterization, and antitumor activity evaluation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101908.
- Parvekar, P., Palaskar, J., Metgud, S., Maria, R., & Dutta, S. (2020). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomaterial Investigations in Dentistry*, 7(1), 105-109.
- Poulose, S., Panda, T., Nair, P. P., & Theodore, T. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(2), 2038-2049.

- Prathna, T. C., Raichur, A. M., Chandrasekaran, N. & Mukherjee, A. (2011). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 82, 152-9.
- Prema, P., Veeramanikandan, V., Rameshkumar, K., Gatasheh, M. K., Hatamleh, A. A., Balasubramani, R., & Balaji, P. (2022). Statistical optimization of silver nanoparticle synthesis by green tea extract and its efficacy on colorimetric detection of mercury from industrial wastewater. *Environmental Research*, 204, 111915.
- Quintero Q. C., Acevedo, N., Zapata G. J., Botero, L. E., Quintero, J., Zárata T. D., y Pérez, V. Z. (2019). Optimization of silver nanoparticle synthesis by chemical reduction and evaluation of its antimicrobial and toxic activity. *Biomaterials Research*, 23(1), 1-15.
- Rastogi, L., & Arunachalam, J. (2011). Sunlight based irradiation strategy for rapid green synthesis of highly stable silver nanoparticles using aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and their antibacterial potential. *Materials Chemistry and Physics*, 129(1-2), 558-563.
- Sánchez V. M. T. (2020). *Estudio de condiciones físicas y químicas en la biosíntesis de nanopartículas de plata usando infusión de chía (Salvia hispanica) e inulina de agave* (Tesis de Maestría). Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara, Ameca, Jalisco, México.
- Sánchez, M. M. (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos.
- Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K. S., & Ravikumar, V. (2013). *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 80-84.
- Santos, T. S., Silva, T. M., Cardoso, J. C., Albuquerque-Júnior, R. L. D., Zielinska, A., Souto, E. B., ... & Mendonça, M. D. C. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles mediated by entomopathogenic fungi: Antimicrobial resistance, nanopesticides, and toxicity. *Antibiotics*, 10(7), 852.

- Sathyavathi, R., Krishna, M. B., Rao, S. V., Saritha, R., & Rao, D. N. (2010). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract and their application in nonlinear optics. *Advanced Science Letters*, 3(2), 138-143.
- Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2), 168-171.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M. G. H., Saradhi, P. P., Khanna, P. K., & Arora, S. (2012). Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 2225-2233.
- Sharma, R. (2021). Synthesis of *Terminalia bellirica* fruit extract mediated silver nanoparticles and application in photocatalytic degradation of wastewater from textile industries. *Materials Today: Proceedings*, 44, 1995-1998.
- Siddiqi, Khwaja Salahuddin, Azamal Husen, and Rifaqat A.K. Rao. (2018). "A Review on Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Biocidal Properties." *Journal of Nanobiotechnology* 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>.
- Siddiqui, M. N., Redhwi, H. H., Achilias, D. S., Kosmidou, E., Vakalopoulou, E., & Ioannidou, M. D. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles and study of their antimicrobial properties. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(2), 423-433.
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K. H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1), 1-24.
- Singh, M., Manikandan, S., & Kumaraguru, A. K. (2011). Nanoparticles: a new technology with wide applications. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 1(1), 1-11.
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588-599.

- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177-182.
- Song, J. Y., & Kim, B. S. (2008). Biological synthesis of bimetallic Au/Ag nanoparticles using Persimmon (*Diopyros kaki*) leaf extract. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 25, 808-811.
- Tan, P., Li, H., Wang, J., & Gopinath, S. C. (2021). Silver nanoparticle in biosensor and bioimaging: Clinical perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(6), 1236-1242. <https://doi.org/10.1002/bab.2045>
- Vivek, R., Thangam, R., Muthuchelian, K., Gunasekaran, P., Kaveri, K., & Kannan, S. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles from *Annona squamosa* leaf extract and its in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *Process Biochemistry*, 47(12), 2405-2410.
- Yaqoob, A. A., Umar, K., & Ibrahim, M. N. M. (2020). Silver nanoparticles: various methods of synthesis, size affecting factors and their potential applications—a review. *Applied Nanoscience*, 10, 1369-1378.
- Ye, Dongdong, Zibiao Zhong, Hui Xu, Chunyu Chang, Zixuan Yang, Yanfeng Wang, Qifa Ye, and Lina Zhang. (2016). “Construction of Cellulose/Nanosilver Sponge Materials and Their Antibacterial Activities for Infected Wounds Healing.” *Cellulose* 23 (1): 749–63. <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0851-4>.
- Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*, 5(1), 69-81.
- Zhang W, Xu W, Li J, Liu H, Li Y, Lou Y, Jin W. (2018). Comparative catalytic and bacteriostatic properties of silver nanoparticles biosynthesized using three kinds of polysaccharide. *AIP Advances*. 8(6): 1-8. <https://doi.org/10.1063/1.5034479>
- Zia, M., Gul, S., Akhtar, J., Ul Haq, I., Abbasi, B. H., Hussain, A., Naz, S. & Chaudhary, M. F. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles from grape and tomato juices and evaluation of biological activities. *IET Nanobiotechnology*, 11(2).

# ANEXOS



# ANEXO 1 – Cartel “Efecto de la Inulina de agave en la producción de nanopartículas de plata”

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Efecto de la Inulina de agave en la producción de nanopartículas de plata

M. T. Sánchez-Vieyra<sup>1</sup>, E. Doaguera-Cortezas<sup>2</sup>, M. Courel-Pedraza<sup>1</sup> y D.O. Doaguera-Galindo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Físico-Matemáticas, <sup>2</sup>Dpto. Cs. Salud, <sup>3</sup>Dpto. Cs. Naturales y Exactas, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara, Carretera Guadalajara-Ameca Km. 45.5, C.P. 40500, Ameca, Jalisco, México  
[mtsanchez@ciqa.univ.guaj.mx](mailto:mtsanchez@ciqa.univ.guaj.mx)

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Introducción

Aplicación: Medicina (Singh et al., 2016), Agricultura (Jahromi et al., 2018; Pinar, 2021)

Método de síntesis química:  $AgNO_3 + \text{Reductor químico}$  →  $Ag^0 + \text{Estructura Reductora}$

Método de Síntesis Verde:  $AgNO_3 + \text{Compuesto orgánico}$

Fuente de Inulina: Inulina de Agave

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Material y método

Preparación de las reacciones

Material:  $AgNO_3$ , Inulina, Agente Reductor

Caracterización: Difracción de Rayos X, Microscopía Electrónica de Transmisión

Experimento	Inulina (g)	$AgNO_3$ (mM)	Volumen (ml)
Experimento 1	2	0.01	30
Experimento 2	1.5	0.01	30
Experimento 3	1	0.01	30

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Resultados

Gráfica de Longitud de Onda vs Absorbancia (a)

Gráfica de Longitud de Onda vs Radio (b)

Gráfica de Tiempo vs Absorbancia (c)

Aperturas ópticas de los tres experimentos

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Resultados

Gráfica de Número de Partículas vs Diámetro (nm)

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) (a, b, c)

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Conclusiones

- Con la inulina de agave se obtuvieron exitosamente AgNPs cuasi esféricas de tamaño menor a 35 nm, y predominan las de diámetro alrededor de 5 nm.
- Las AgNPs en suspensión más pequeñas están dispersas.
- La inulina de agave influye directamente en la cantidad de AgNPs.
- Hasta el mes 9 las NPs se mantuvieron estables.

2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Referencias

Álvarez, A., Haza, A. I. & Morales, P. (2012). Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos biológicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Colombiana de Ciencias Exactas*, 7(2), 1-23.

Bansal, T., Ujic-Mamovic, M., Cooper, P., & Potesky, N. (2016). Inulin-a versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of Esports and Food Chemicals*, 1(2), 1132.

Genia, M. A. (2011). Surface plasmon in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44(26), 263001.

Doaguera-Galindo, D. O., Doaguera-Cortezas, E., & Ponce-Zepeda, D. (2020). Silver nanoparticles synthesis using biosynthesis of jaborato pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as a reducing agent. *Journal of Nanoparticles*, 14(2), 526012.

Pillai, Z. S., & Komet, P. V. (2004). What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(2), 945-951.

Román, M., & Subapriya, M. S. (2012). Green synthesis of silver nanoparticles. *Int J Pharm Med Biol Sci*, 1(1), 34-41.

Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 24(7), 556-559.


2<sup>do</sup> ENCUENTRO DE CUERPOS ACADÉMICOS EN CIENCIAS E INGENIERÍAS | 1 y 2 de noviembre de 2022 | UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Agradecimientos

Al Conacyt  
Al Centro Universitario los Valles

*Gracias*

# ANEXO 2 – Póster “Síntesis de nanopartículas de plata usando inulina de agave”



## Síntesis de nanopartículas de plata usando inulina de agave

M. T. Sánchez-Vieyra<sup>1</sup>, D. O. Oseguera-Galindo<sup>2</sup>, E. Oseguera-Contreras<sup>3</sup> y M. Ojeda-Martínez<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Físico Matemáticas, <sup>2</sup>Dpto. Ciencias Naturales y Exactas, <sup>3</sup>Dpto. Ciencias de la Salud, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara, Carretera Guadalajara-Ameca Km 45.5, C.P 46600, Ameca, Jalisco, México.

---

### Introducción

Gracias a la nanotecnología se han logrado fabricar nuevos materiales que en dimensiones nanométricas mejoran sus propiedades [1]. Un ejemplo importante son las nanopartículas de plata (AgNPs). Este nanomaterial posee propiedades antibacterianas, antifúngicos, antivirales y antiinflamatorias, que se han aprovechado en la industria alimentaria y textil, en la agricultura y en la medicina [2]. Su fabricación se ha realizado tanto por métodos químicos, físicos y biológicos [3]. Sin embargo, la ventaja de los métodos biológicos es que se emplean protocolos más seguros, de baja o nula toxicidad, compatibles con el medio ambiente, económicos y sencillos [4].

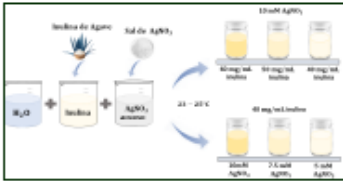
**Objetivo.** Sintetizar AgNPs mediante AgNO<sub>3</sub> en disolución con inulina de agave y estudiar los efectos de la concentración de inulina, AgNO<sub>3</sub> y tiempo de almacenamiento en la tasa de formación de las nanopartículas.

**Hipótesis.** Se obtendrán AgNPs en suspensión líquida a partir del AgNO<sub>3</sub>, en dilución acuosa con inulina de agave, mediante un método sencillo, seguro, económico y ecológico.

### Material y Método

➤ **Materiales:** AgNO<sub>3</sub>, inulina de agave y agua destilada.

➤ **Experimentos.** Se prepararon y almacenaron en la oscuridad y en reposo a temperatura ambiente.



➤ **Caracterización.** Se monitoreó la cinética de formación por más de 30 días con un Espectrofotómetro UV-Vis GENESYS 150. Los experimentos de mayores concentraciones se observaron en un MET JOEL JEM-2010.

---

### Resultados

#### Efecto de la inulina de agave y el tiempo de almacenamiento

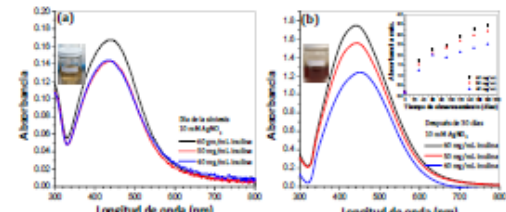


Fig. 2 Absorbancia UV-Vis de las NPs obtenidas con 10 mM de AgNO<sub>3</sub> en disolución con diferentes concentraciones de inulina (a) día de la síntesis (b) después de 30 días. En el recuadro, la absorbancia frente al tiempo de almacenamiento.

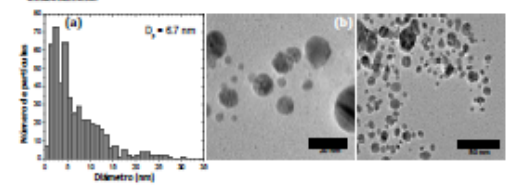


Fig. 3 (a) Distribución de tamaños de las NPs obtenidas con 10 mM de AgNO<sub>3</sub> en disolución con 40 mg/L de inulina de agave, (b) Micrografías TEM de las NPs.

#### Efecto del AgNO<sub>3</sub> y el tiempo de almacenamiento

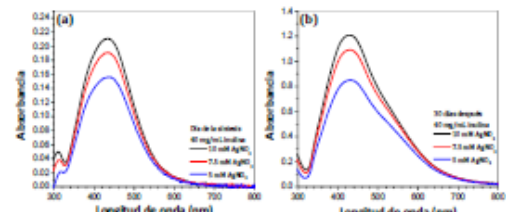


Fig. 4 Absorbancia UV-Vis de las NPs obtenidas con 40 mg/L de inulina en diferentes concentraciones de AgNO<sub>3</sub>, (a) día de la síntesis (b) 30 días después.

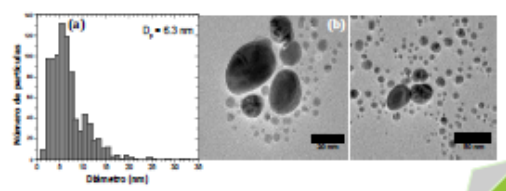


Fig. 5 (a) Distribución de tamaños de las NPs obtenidas con 10 mM de AgNO<sub>3</sub> en disoluciones 40 mg/L de inulina de agave, (b) Micrografías TEM de las NPs.

---

### Conclusiones

- Se obtuvieron exitosamente nanopartículas de plata en suspensión líquida a partir del AgNO<sub>3</sub> en dilución acuosa con inulina de agave.
- El método fue muy simple, económico y amigable con el medio ambiente.
- La mayor formación de nanopartículas se dio dentro de los 30 días de su preparación.
- Las AgNPs obtenidas son de forma cuasi esférica y en su mayoría de tamaños menores a 15 nm. El tamaño promedio fue de alrededor de 6 nm.
- Al incrementar tanto la concentración del AgNO<sub>3</sub> como de la inulina de agave se incrementa la velocidad de producción de las nanopartículas.

### Referencias

- Hernández, D. W. D. (2013). *Síntesis de Nanopartículas de Plata Mediamente Catalizada por Quercetin sp. y su incorporación en matrices poliméricas nanofibras* (Tesis de maestría). Centro de Investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coahuila.
- Amador, A., Haza, A. I. & Morán, P. (2013). Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas*, 3(2), 1-22.
- Oseguera, G. D. O., Valenzuela, L. M. T., Carrillo, F. A. M., Oseguera, C. E., & Higuera, A. S. (2018). Theoretical considerations over the production of silver nanoparticles by laser ablation in distilled water. *Journal of Nanoparticles*, 13(4), 044003.
- Shah, J., Datta, T., Kish, K. H., Jorani, M., Hernández, P., & Kumar, P. (2018). Green synthesis of metals and their oxide nanoparticles applications for environmental remediation. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 1-24.

---

### Agradecimientos

Al CONACYT por su apoyo financiero a través del programa de becas nacionales. Al Centro Universitario los Valles de la Universidad de Guadalajara por facilitar sus instalaciones y equipo de laboratorio para la realización de este trabajo. Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología por su apoyo con el MET.

---

### Contacto

vieyra\_b4@hotmail.com, david.oseguera@academicos.udg.mx  
 312 105 1307

## ANEXO 3 – Plática “Alta producción de nanopartículas de plata en inulina de agave y su efecto bactericida contra *Escherichia coli*”



### Alta producción de nanopartículas de plata en inulina de agave y su efecto bactericida contra *escherichia coli*

María Teresa Sánchez Vieyra

11 de octubre 2023

 **smf.**  
SOCIEDAD MEXICANA DE FÍSICA

A quien corresponda.

Tenemos el gusto de informarle que el trabajo con clave única: LXVI-006462 y cuyo título es: **ALTA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN INULINA DE AGAVE Y SU EFECTO BACTERICIDA CONTRA ESCHERICHIA COLI**, de los autores:

- Sánchez Vieyra María Teresa (Presentador)  
Universidad de Guadalajara
- Ojeda Martínez Miguel  
Universidad de Guadalajara
- Ocegüera Contreras Eden  
Universidad de Guadalajara
- Rodríguez Preciado Sergio Yair  
Universidad de Guadalajara
- Díaz Zaragoza Mariana  
Universidad de Guadalajara
- Martínez Zérega Brenda Esmeralda  
Universidad de Guadalajara
- González Solís José Luis  
Universidad de Guadalajara
- Oseguera Galindo David Omar  
Universidad de Guadalajara

Fue aceptado para su presentación tipo plática en la sesión de Materia Condensada y Nanotecnología el día 11 de octubre de 2023 en Salón 6 dentro del programa del LXVI Congreso Nacional de Física.

Se extiende la presente constancia el día 29 de enero de 2024.

**ATENTAMENTE**

Comité Científico  
Sociedad Mexicana de Física



  
 **La Sociedad Mexicana de Física**

Agradece la asistencia y participación de:

**MARÍA TERESA SÁNCHEZ VIEYRA**  
CENTRO UNIVERSITARIO DE LOS VALLES,  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

en el **LXVI Congreso Nacional de Física**  
Centro de Convenciones y Exposiciones del 8 al 13 de octubre de 2023  
MORELIA, MICHOACÁN

  
Dr. Julio G. Mendoza Álvarez  
PRESIDENTE

AP: 70-348, Coyacán 0481, CDMX    (5255) 56224946/56224448    [www.smf.mx](http://www.smf.mx)    /SMF/Info

**Eco-friendly high-rate formation of silver nanoparticles in agave inulin and its bactericidal effect against *Escherichia Coli***

# Eco-friendly high-rate formation of silver nanoparticles in agave inulin and its bactericidal effect against *Escherichia coli*

María Teresa Sánchez-Vieyra<sup>1</sup>, Miguel Ojeda-Martínez<sup>1</sup>, Eden Ocegüera-Contreras<sup>2</sup>,  
Sergio Yair Rodríguez-Preciado<sup>2</sup>, Mariana Díaz-Zaragoza<sup>2</sup>, Brenda Esmeralda Martínez-Zérega<sup>3</sup>,  
José Luis González-Solís<sup>3</sup>, David Omar Oseguera-Galindo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Valles, Dpto. Cs. Naturales y Exactas, Carretera Guadalajara-Ameca Km 45.5, Ameca, Jalisco, México, 46600

<sup>2</sup>Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Valles, Dpto. Cs. Salud, Carretera Guadalajara-Ameca Km 45.5, Ameca, Jalisco, México, 46600

<sup>3</sup>Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de los Lagos, Laboratorio de Biofísica y Ciencias Biomédicas, Enrique Díaz de León, Paseo de la Montaña, Lagos de Moreno, Jalisco, México, 47460

A high rate of silver nanoparticle formation, effective against the *Escherichia coli* (*E. coli*) bacterium, was obtained for the first time by means of a simple, eco-friendly, and low-cost green method in a solution of agave inulin. The study was carried out using the traditional method, in which the effects of the concentration of agave inulin, AgNO<sub>3</sub>, temperature, and pH on the synthesis were analyzed by UV-Vis spectroscopy and transmission electron microscopy (TEM). Most of the nanoparticles produced were spherical with a size less than 10 nm. In a sample with 20 mg/mL of agave inulin, 1 mM of AgNO<sub>3</sub>, T = 23°C, and pH = 12, the highest percentage of Ag<sup>+</sup> ions available in the solution were reduced for the formation of nanoparticles in less than 40 min, whereas a sample prepared with 60 mg/mL of agave inulin, 10 mM of AgNO<sub>3</sub>, T = 23°C, pH = 12, and a storage time of 40 min showed a significant bactericidal effect on the *E. coli* strain. Agave inulin is a good biological compound for the formation of small, spherical silver nanoparticles. A pH of 12 favors a higher production speed of the silver nanoparticles and better use of the available Ag<sup>+</sup> ions. In addition to this, the concentration of AgNO<sub>3</sub> is a determining factor for increased formation of the nanoparticles necessary to bactericidal effect.

Keywords: *silver nanoparticles, green synthesis, agave inulin, absorbance, bactericidal effect*

## 1. Introduction

The bactericidal effect of silver nanoparticles (AgNPs), presented in the nanoscale range, has potential applications in areas such as health, medicine, and agriculture [1, 2]; and many studies have been performed based on chemical, physical, and green synthesis methods [3]. However, green synthesis is getting special attention for being a simple, eco-friendly, and low-cost method of synthesizing silver nanoparticles [4, 5].

In 2003, the preparation of silver nanoparticles using a type of plant, particularly an alfalfa plant, was reported for the first time in 2003

by Gardea et al. [6]. Since then, many articles have reported different plants, leaves, and seeds as synthesis medium [7, 8]. Green methods of silver nanoparticle synthesis consist of dilute silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>) as a precursor of silver ions (Ag<sup>+</sup>) in a natural extract, where the biological molecules play an important role as a reducing and stabilizing agent, favoring nanoparticle formation [9].

Agave inulin is a reducing sugar, obtained from agave pineapples, which are widely cultivated in Jalisco, México [10]. It consists of a chain of 2 to 60 fructose molecules terminated at the reducing end with glucose. Its monosaccharides are linked by β(2-1) glycosidic bonds terminated at the reducing end by an α-D-(1-2)-glucopyranoside [11]. Agave inulin was recently shown to successfully

\* E-mail: david.oseguera@academicos.udg.mx

contribute to reducing and stabilizing the formation of silver nanoparticles [12]. In addition, because of its physicochemical properties, it has a wide number of applications in the food, pharmaceutical, and chemical industries [13–16].

Among the desirable characteristics for the synthesis of silver nanoparticles is the rate formation, which is associated with the nanoparticle concentration and is a value that has an effect on a specific application. For instance, in order to study antibacterial activity, in addition to the size and the shape of the nanoparticles, it is important to use an adequate concentration of AgNPs [17, 18].

Usually, to study the rate formation of AgNPs, UV-Vis spectrophotometry is used to measure the maximum absorbance around 400 nm. Furthermore, the linear relation from Lambert-Beer (Eq. 1):

$$A = \alpha l C \quad (1)$$

where  $A$  is the absorbance,  $\alpha$  is the absorption coefficient,  $l$  is the path radiation length through the sample, and  $C$  is the concentration of suspended nanoparticles in the absorbent, indicate that a higher concentration of nanoparticles in suspension corresponds to a larger absorbance peak, and an increase in the absorbance peak means that the nanoparticle formation also increased [19].

Nevertheless, in agreement with the Mie theory, if the absorption peak is shifted toward a larger wavelength, this suggests changes in the size of the nanoparticles [20].

Either the formation rate or the nanoparticle concentration could be affected by some experimental factors including salt concentration, natural extract concentration, reaction temperature, and pH of the solution. For instance, after measuring the absorbance of silver AgNPs in *Alcalypha indica* leaf extract, the authors concluded that with an alkaline pH (9 and 11) rapid nanoparticle formation occurs [21]. Moreover, similar results were reported for using *Calendula Officinalis* seed extract, the sample prepared with a pH of 9 and the sample with a temperature of 60°C registered a maximum absorption [22].

In addition, when AgNPs were synthesized in a neem leaf extract with a different pH (9–13), rapid

formation of nanoparticles was evident in a few minutes. As the pH increased, the absorption peak increased too, and it shifted towards a longer wavelength, indicating an increase in the size of synthesized AgNPs [23]. Similar results were reported in nanoparticles using leaf extracts of *Ocimum sanctum* (Tulsi) and its derivative quercetin to different pH levels (pH 7, 8, 9, 10, and 11) [24].

In this work, we present results of the formation of silver nanoparticles by means of a green method using agave inulin as a reducing and stabilizing agent. The effect of agave inulin concentration, AgNO<sub>3</sub> concentration, temperature, and pH on the production of silver nanoparticles is studied. Furthermore, a theoretical estimate of the highest concentration of AgNPs produced is made and its bactericidal effect on the *E. coli* bacterium is analyzed.

## 2. Experimental methods

The optimization of nanoparticle synthesis was carried out using the traditional method, which consists of monitoring the influence of one variable at a time in an experimental response, that is, when only one parameter is changed, and the others remain constant [25]. In this study, agave inulin concentration, AgNO<sub>3</sub> concentration, temperature, and pH are the variables used in the synthesis of AgNPs.

The agave inulin was acquired from the EDU-LAG company (Jalisco, México) in powder form, and silver nitrate salt (AgNO<sub>3</sub>) and sodium hydroxide (NaOH) were acquired from the Sigma Aldrich company.

Prepared samples were kept at room temperature (23°C), except when the effect of temperature was explored, and the samples were duplicated to ensure reproducibility. All samples were covered with aluminum foil and kept in complete rest in the dark. Distilled water was used in all samples, reaching a total volume of 50 mL in each solution.

The monitoring of the absorption spectra of the samples was done with a Genesys 150 UV-Vis spectrophotometer. Nanoparticles were observed with a transmission electron microscope (TEM), JeolJem-2010.

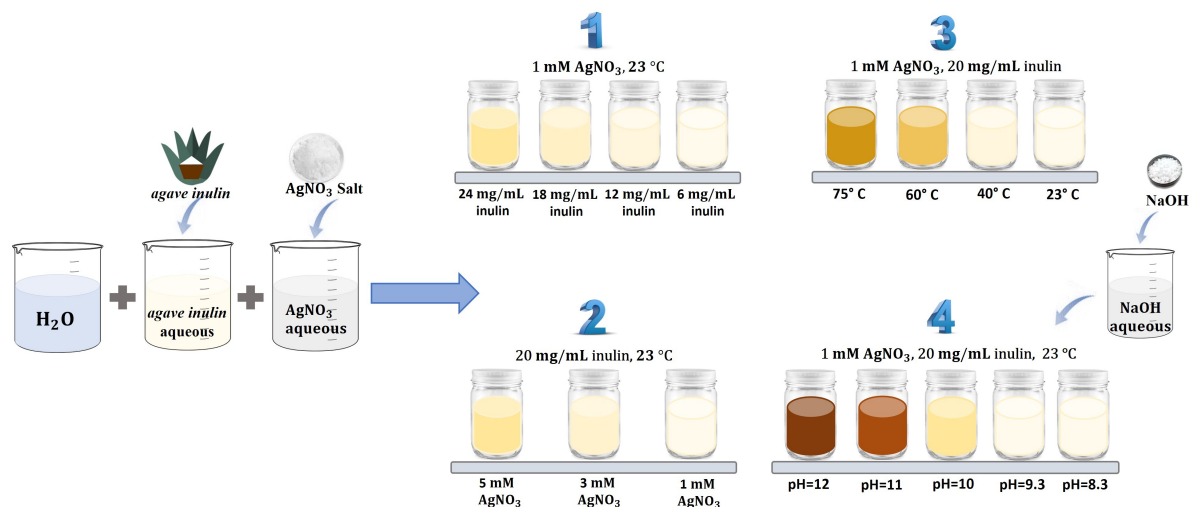


Fig. 1. Experimental setup for the synthesis of AgNPs. Variables were (1) agave inulin; (2)  $\text{AgNO}_3$ ; (3) temperature; (4) pH

The micrographs were prepared using Adobe Photoshop software, then, with ImageJ software, the areas of nanoparticles within pixels were measured and their diameters in nanometers were determined considering the area measured as a circle. Finally, with the Origin program, size distributions were prepared. The distributions were fitted with a log-normal distribution function as defined in Equation (2) with mean  $\bar{x}$  and multiplicative standard deviation  $\sigma$ .

$$f(x) = \frac{A}{\sigma x \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\ln(\frac{x}{\bar{x}}))^2}{2\sigma^2}} \quad (2)$$

Figure 1 shows a scheme of four experiments with different variables (1) inulin concentration (24, 18, 12, 6 mg/mL); (2)  $\text{AgNO}_3$  concentration (5, 3, 1 mM); (3) temperature ((75°C, 60°C, 40°C, 23°C); (4) and pH (12, 11, 10, 9.3, 8.3). In the fourth experiment, in order to adjust the pH in each sample, a molar concentration of 0.1 M sodium hydroxide (NaOH) was prepared and meticulously added in drops to the solution of *agave inulin* until it reached the desired pH value, then the  $\text{AgNO}_3$  solution was added. In the third experiment, the temperature of the *agave inulin* was adjusted by placing the solution on a hot plate with magnetic stirring, and when the solution reached the desired temperature, the  $\text{AgNO}_3$  solution was added. The sample was kept at the desired

temperature for 1 hour, and then it was removed from the magnetic stirring plate and allowed to cool to room temperature.

## 2.1. Effect of agave inulin on the synthesis

Four samples (S1A, S2A, S3A, S4A) with different *agave inulin* concentrations and the same  $\text{AgNO}_3$  concentration, the same temperature, and the same pH were prepared. Table 1 shows the synthesis parameters and the corresponding values used. These samples were analyzed by UV-Vis spectroscopy 23 days after the preparation.

## 2.2. Effect of $\text{AgNO}_3$ on the synthesis

Three samples (S1B, S2B, S3B) with different  $\text{AgNO}_3$  concentrations and the same *agave inulin* concentration, value of temperature, and pH were

Table 1. Parameters and values used in the preparation of samples to study *agave inulin*'s effect on the synthesis of AgNPs

Sample	A	B	C	D
S1A	6	1	23	6.5
S2A	12	1	23	6.5
S3A	18	1	23	6.5
S4A	24	1	23	6.5

A: *agave inulin* (mg/mL); B:  $\text{AgNO}_3$  (mM); C: temperature (°C); D: pH.

Table 2. Parameters and values used in the preparation of samples to study the AgNO<sub>3</sub> effect on the synthesis of AgNPs

Sample	A	B	C	D
S1B	20	1	23	6.5
S2B	20	3	23	6.5
S3B	20	5	23	6.5

A: *agave inulin* (mg/mL); B: AgNO<sub>3</sub> (mM); C: temperature (°C); D: pH.

prepared. Table 2 shows the parameters and their corresponding values used in the synthesis. The samples were analyzed by UV-Vis spectroscopy 22 days after the preparation.

### 2.3. Effect of temperature on the synthesis

Four samples (S1C, S2C, S3C, S4C) with different temperature values and the same *agave inulin* concentration, AgNO<sub>3</sub> concentration, and pH were synthesized. Table 3 shows the parameters and their corresponding values used for the synthesis. The samples were analyzed by UV-Vis spectroscopy 11 days after the preparation. The sample obtained with a temperature of 75°C was analyzed by TEM.

### 2.4. Effect of pH on the synthesis

Five samples (S1D, S2D, S3D, S4D, S5D) with different pH values and the same *agave inulin* concentration, AgNO<sub>3</sub> concentration, and temperature were prepared. Table 4 shows the parameters and the corresponding values used in the synthesis. The samples were analyzed by UV-Vis spectroscopy 40 min after the preparation. The samples S3D

Table 3. Parameters and values used in the preparation of samples to study temperature effect on the synthesis of AgNPs

Sample	A	B	C	D
S1C	20	1	23	6.5
S2C	20	1	40	6.5
S3C	20	1	60	6.5
S4C	20	1	75	6.5

A: *agave inulin* (mg/mL); B: AgNO<sub>3</sub> (mM); C: temperature (°C); D: pH.

Table 4. Parameters and values used in the preparation of samples to study pH effect on the synthesis of AgNPs

Sample	A	B	C	D
S1D	20	1	23	12
S2D	20	1	23	11
S3D	20	1	23	10
S4D	20	1	23	9.3
S5D	20	1	23	8.3

A: *agave inulin* (mg/mL); B: AgNO<sub>3</sub> (mM); C: temperature (°C); D: pH.

(pH = 10) and S2D (pH = 11) were characterized by TEM.

### 2.5. Antibacterial activity of silver nanoparticles

The bactericidal effect of silver nanoparticles was determined using a strain of *E. coli*. This bacterium was extracted from Ameca's river (located in Jalisco, Mexico), and a bacterial culture was characterized in a chromogenic agar (CHROMOgar) and by PCR to confirm its presence by *malB* gene amplification. Subsequently, the bacterium was exposed to two different nanoparticle concentrations labeled S1<sub>bac</sub> and S2<sub>bac</sub>. The first sample of nanoparticles (S1<sub>bac</sub>) was synthesized using a 10 mM of AgNO<sub>3</sub> in solution with *agave inulin* at a concentration of 60 mg/mL. The second sample (S2<sub>bac</sub>) was synthesized using 1 mM of AgNO<sub>3</sub> in solution with *agave inulin* at a concentration of 20 g/mL. Both samples were prepared with a pH of 12.

To determine the antibacterial activity of the nanoparticles, the micro dilution method was employed [26]. Table 5 shows the content of each of the test tubes. The six tubes each contained 5 mL of Luria Bertani (LB) broth. Tubes 2–6 contained 100 μL of the bacterial culture at a concentration of 10<sup>8</sup> CFU/mL. In tube 3, 100 μL of *agave inulin* was added to reach a concentration of 60 mg/mL, and in tube 6 100 μL of *agave inulin* was added to the broth to reach a concentration of 20 mg/mL to verify the absence of an antibacterial effect by *agave inulin*. Finally, instead of *agave inulin* solution, tubes 4 and 5 received 100 μL of silver nanoparticles corresponding to the samples



Table 5. Contents of the test tubes to study antibacterial activity

Tube	LB (mL)	<i>E. coli</i> ( $\mu$ L)	Inulin ( $\mu$ L)	Sample ( $\mu$ L)
1	5	–	–	–
2	5	100	–	–
3	5	100	100	–
4	5	100	–	S1 <sub>bac</sub> (100)
5	5	100	–	S2 <sub>bac</sub> (100)
6	5	100	100	–

S1<sub>bac</sub> and S2<sub>bac</sub>, respectively. The tubes were incubated at 37°C for 18–24 h, and the antibacterial effect was detected by the unaided eye.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of agave inulin on the synthesis

Figure 2 presents UV-Vis absorption spectra of the samples prepared with different agave inulin concentration. Details of the mixing proportions are shown in Table 1 (in the experimental section), 23 days after the preparation. The samples S2A, S3A, and S4A exhibited an absorption peak at 442, 440, and 439 nm, respectively, and this indicates that quasi-spherical AgNPs were formed [27]. Nevertheless, for the sample S1A, with less agave inulin, the absorption peak did not appear, suggesting insufficient or null nanoparticle formation. This occurred even though S1A had the same molar concentration of AgNO<sub>3</sub> as the rest of these

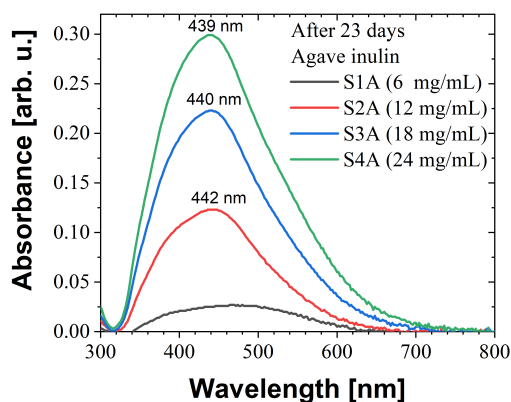


Fig. 2. UV-Vis absorbance of nanoparticles obtained using different agave inulin concentrations

samples; therefore, we can say that the concentration of agave inulin molecules plays a key role in nanoparticle formation.

The hydrolysis of agave inulin is relatively stable at room temperature and neutral pH, so upon the addition of water, the inulin chain undergoes cleavage of the glycosidic bonds and finally breaks down into its monosaccharides [14]. This leads to hydroxyl ion formation, favoring the reduction of Ag<sup>+</sup> ions [28]. The natural polysaccharide has been considered to contribute in the reduction and stabilization of AgNPs [29].

In addition, as can be seen in Figure 2, there are some differences in the spectra. The nanoparticles obtained using a higher concentration of agave inulin influenced the amplification of the absorption peak. In agreement with the Lambert-Beer relation, Equation (1), this can be associated with an increase in nanoparticle concentration. Furthermore, the absorption peak shifts slightly toward shorter wavelengths, suggesting a slight decrease in nanoparticle size.

#### 3.2. Effect of AgNO<sub>3</sub> on the synthesis

Figure 3 shows the UV-Vis absorption spectra of the samples prepared with different AgNO<sub>3</sub> concentrations. Details of the mixing proportions are shown in Table 2 (in the experimental section), after measuring the absorbance 22 days after the preparation. Similarly, AgNO<sub>3</sub> concentrations had an effect on the intensification and in shifting the

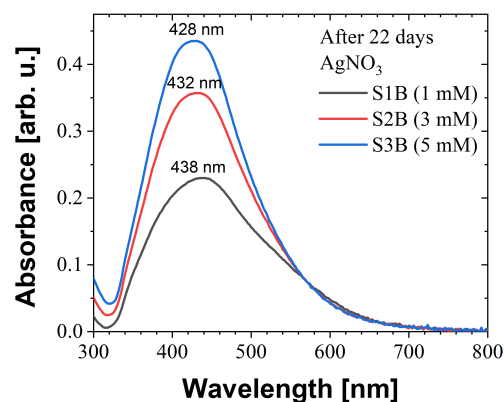


Fig. 3. UV-Vis absorbance of nanoparticles obtained using different AgNO<sub>3</sub> concentration

absorption peak to shorter wavelengths. This can be explained by the effect of the concentration and by a decrease in the nanoparticle size [9].

### 3.3. Effect of temperature on the synthesis

Figure 4 presents the UV-Vis absorption spectra corresponding to the samples obtained with different temperatures. Details of the mixing proportions are shown in Table 3 (in the experimental section) measuring the absorbance 11 days after the preparation. Samples S1C and S2C show less absorption around 400 nm; hence, there is little formation of AgNPs.

By contrast, sample S3C, obtained at 60°C, shows a more intense absorption peak. However, at 75°C, the sample S4C presents an absorption peak that is still more intense. Its absorbance value is the highest in comparison with the results presented in Figures 2 and 3. Hence, temperature influenced the acceleration of the nanoparticle formation.

In addition, Figure 5 presents the corresponding size distribution fitted with the log-normal model and micrographs of nanoparticles obtained with a temperature of 75°C (sample S4C). In this analysis, 354 particles were considered, where most of the nanoparticles exhibit a relatively small size of <10 nm with an average size of 7.99 nm. In agreement with the micrographs, the nanoparticles presented a quasi-spherical shape. This result reinforces the interpretation inferred from the profile

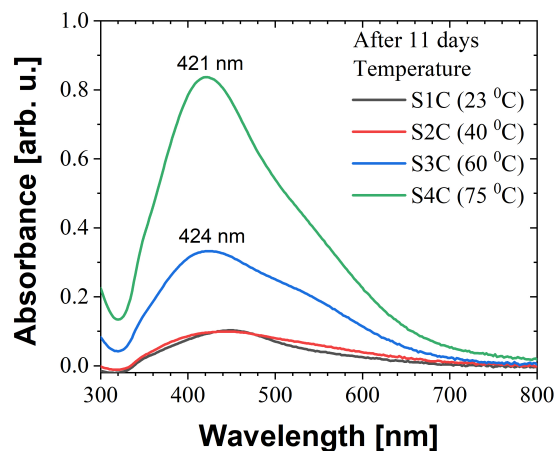


Fig. 4. UV-Vis absorbance of nanoparticles obtained using different temperatures

of the absorption on the basis of the nanoparticle shape.

### 3.4. Effect of pH on the synthesis

Figure 6 presents UV-Vis absorption spectra of the samples obtained with different pHs; details of the mixing proportions are shown in Table 4 (in the experimental section). The absorption peak became more intense as pH increased. In fact, within the first forty minutes, the sample with a pH of 11 showed an absorbance of 1.7, whereas the sample with the highest pH had an absorption peak so intense that it exceeded the measurable range and its center could not be observed. In comparison with the other parameters used here, this indicates that a pH of 12 has more of an effect on the acceleration of nanoparticle formation. This result also correlates with the sample's dark color and the resulting difficulty in measuring light transmission.

Regarding the non-definition of this absorption peak, it was monitored while diluting the sample with distilled water with the following dilutions of distilled water to silver nanoparticles: 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 and 5:1, where the first number is milliliters of distilled water diluting 1 milliliter of silver nanoparticles solution (the second number) in every case. Figure 7(a) shows the UV-Vis spectra of this monitoring. The absorbance decreases with the dilution with distilled water, showing that, despite the impossibility of observing its absorption peak, it is possible to recover the profile of the absorption peak generated by the diluted silver nanoparticles and thus identifying the center of its absorbance maximum, which is 402 nm. In this way, it can be observed that the absorption peak shifted towards a shorter wavelength (from 432 to 402) by means of increasing the pH (see Figures 6 and 7a), suggesting that the nanoparticle size decreases with the pH.

To understand the scope of the maximum absorbance of the original sample, absorbance monitoring allowed us to generate a calibration line, as seen in Figure 7(b). In this linear regression plot, an absorbance of 11.9 was calculated. Furthermore, since the sample was diluted into 3:1, 4:1, and 5:1, the profile of its absorption peak is similar. On the other hand, the linear regression predicts

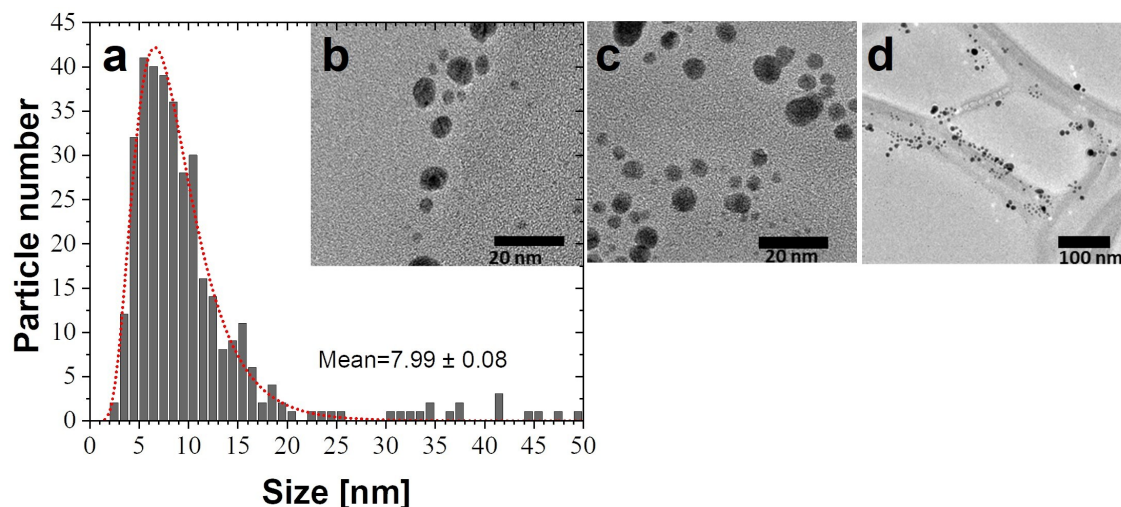


Fig. 5. (a) Size distribution, fitted with a Log-normal model (dotted line) from several micrographs (for instance b, c, and d) of AgNPs obtained using a temperature of 75°C

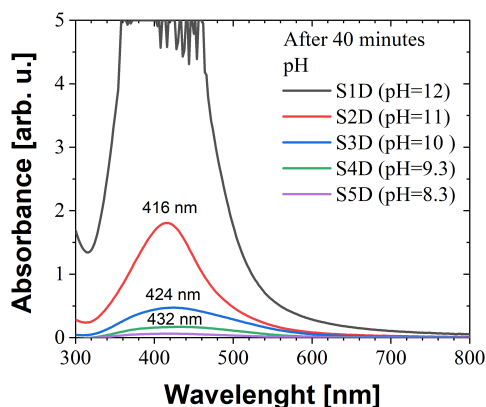


Fig. 6. UV-Vis absorbance of nanoparticles obtained using different pH values

with an acceptable precision the absorbance monitoring by UV-Vis spectroscopy.

In addition, Figure 8 presents a size distribution of the sample obtained using a pH of 11 (Sample S2D), there being 282 nanoparticles considered in the statistic, resulting in an average size of 6.04 nm. On the other hand, Figure 9 presents the size distribution of the sample obtained using a pH of 10 (Sample S3D), with 311 nanoparticles considered, resulting in an average size of 8.03 nm. The size distribution of nanoparticles obtained with

a pH of 11 is narrower and presents the smallest nanoparticles. This result is similar to the work in which the authors published the effect of pH on the synthesis of AgNPs using citric and malic acids and reporting that the average size of the quasi-spherical nanoparticles decreases in a pH of 10 to 11 [30].

NaOH plays an important role in the intensification of the rate of nanoparticle formation. NaOH is a strong base that dissociates completely in solution to form hydroxyl ions [31]. Then, a large amount of these ions in an aqueous solution of inulin leads to an increment in its pH, which directly influences a notable increase in the speed of breaking the glycosidic bonds that join the fructose units that make up inulin [14]. Subsequently, as there is a greater number of fructose units, in consequence, there is a greater number of reducing molecules that immediately tend to give electrons to the  $\text{Ag}^+$  ions being reduced to  $\text{Ag}^0$  and consequently there is a rapid formation of silver nanoparticles.

A second important factor is the temperature. Nanoparticle preparation can be simpler without adjusting the pH and its temperature, and only using ingredients such as agave inulin,  $\text{AgNO}_3$ , and distilled water. Although it is very important

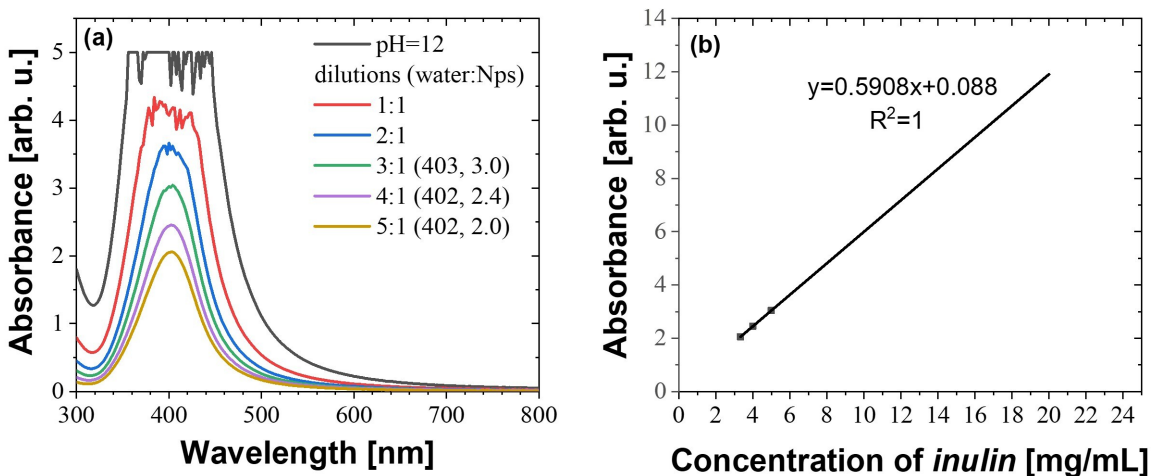


Fig. 7. (a) UV-Vis spectra of nanoparticles obtained with a pH of 12 using different solutions in water. (b) Line calibration of the maximum absorbance versus the agave inulin concentration (mg/mL)

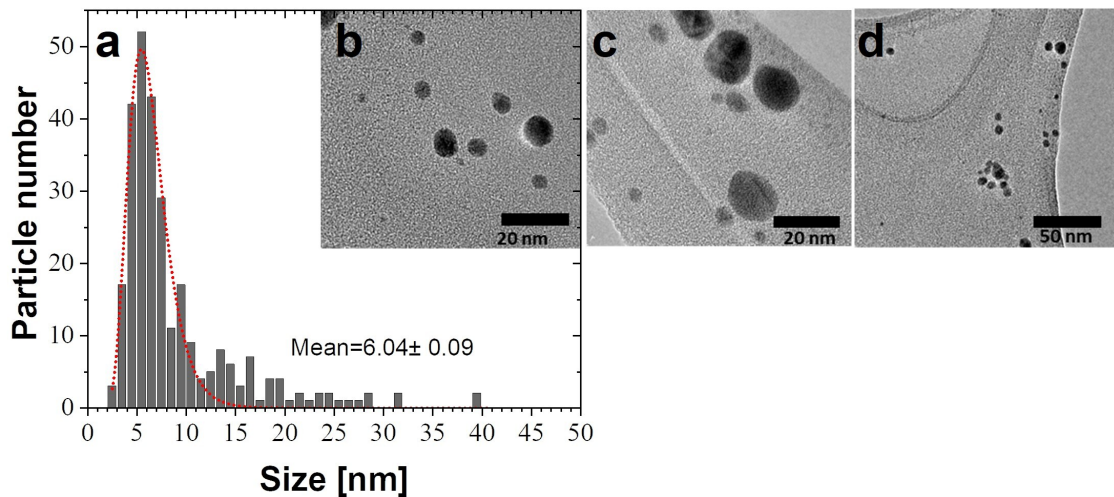


Fig. 8. (a) Size distribution, fitted with a Log-normal model (dotted line) from several micrographs (for instance b, c, and d) of AgNPs obtained using pH 11

to consider the effect of storage time, because a sample used immediately will employ a smaller concentration than expected.

### 3.5. Antibacterial activity

It has been reported that bactericidal properties depend on nanoparticle size; for instance, if the silver nanoparticles have a diameter of  $\approx 1\text{--}10$  nm, they present a direct interaction with

the bacteria [32]. In addition, the concentration of this type of nanoparticle is another characteristic that affects bacterial growth [33, 34].

In this study, two samples, S1<sub>bac</sub> and S2<sub>bac</sub>, were prepared with a molar concentration of 10 mM and 1 mM of AgNO<sub>3</sub> in dissolution with 60 mg/mL and 20 mg/mL of agave inulin, respectively. Each one was fixed to a pH of 12 and were prepared at the same temperature (see Section 2.5

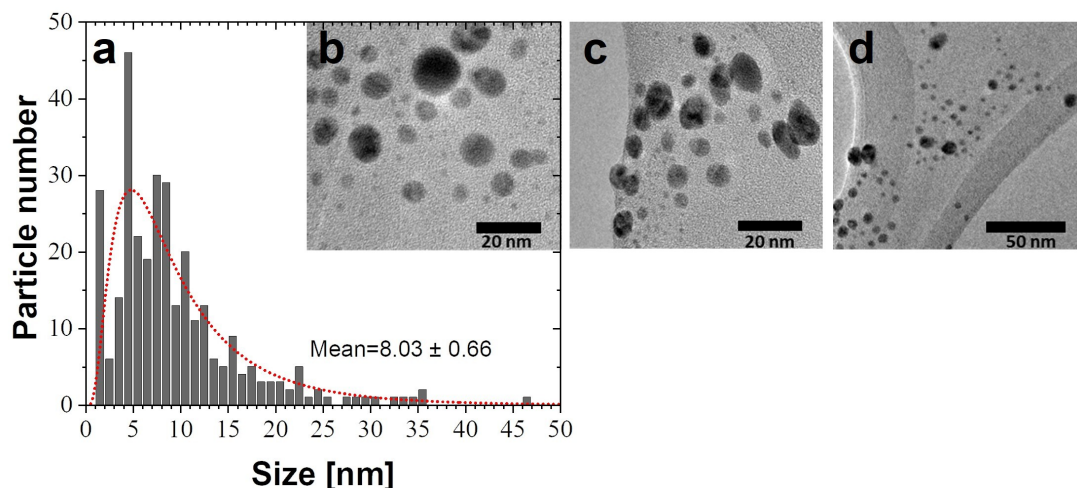


Fig. 9. (a) Size distribution, fitted with a Log-normal model (dotted line) from several micrographs (for instance b, c, and d) of AgNPs obtained using pH 10

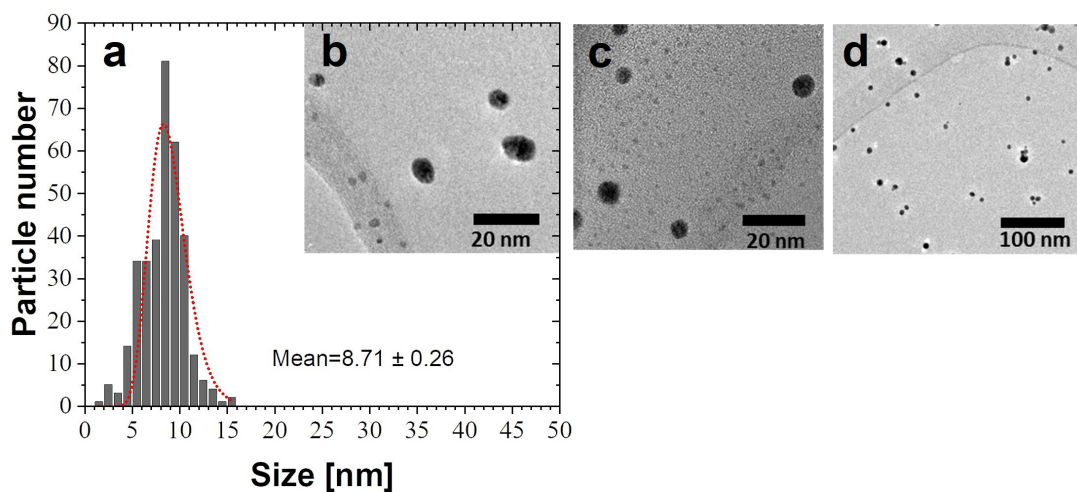


Fig. 10. (a) Size distribution, fitted with a Log-normal model (dotted line) from several micrographs (for instance b, c, and d) of AgNPs obtained using a pH of 12

for details of the preparation). Considering that the sample S1<sub>bac</sub> showed an antibacterial effect, consequently, the next theoretical consideration was made to determine a nanoparticle concentration (nanoparticles/mL).

For this, it is necessary to know the average size of the nanoparticle, which can be estimated from analysis of the micrographs taken by TEM. Figure 10 presents the size distribution and three micrographs of the sample S1<sub>bac</sub>. Several

nanoparticles smaller than 10 nm can be observed. If the average size of  $D_p = 8.71$  nm and assuming that the nanoparticle has a spherical shape, its mass can be written as  $m_p = \frac{\pi}{6} D_p^3 \rho_{Ag}$ , where  $\rho_{Ag}$  represents the silver density ( $10.49 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ). Substituting the density and the particle diameter,  $m_p = 3.6 \times 10^{-15}$  mg is obtained.

The concentration of silver in the sample is given by  $C_{Ag} = MW_{Ag} C_{AgNO_3}$ , where  $MW_{Ag}$  is the atomic weight of silver ( $107.8682 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) and

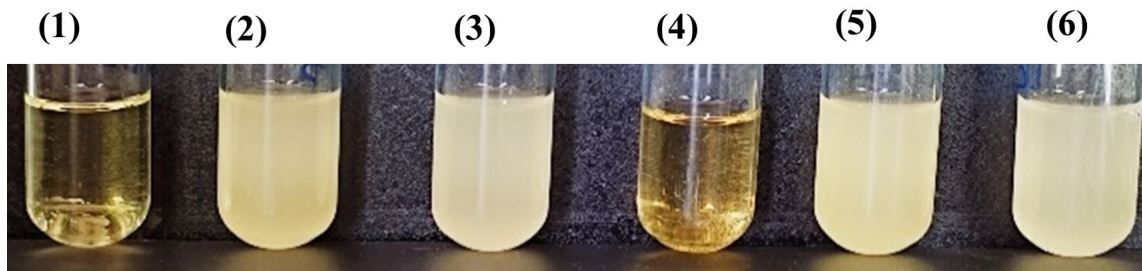


Fig. 11. Bactericidal effect. LB medium was used to determine the bactericidal effect. (1) Positive control: LB medium; (2) Negative control: LB medium and 100  $\mu\text{L}$  *E. coli* strain; (3) LB medium, 100  $\mu\text{L}$  *E. coli* strain, and 100  $\mu\text{L}$  agave inulin; (4) LB medium, 100  $\mu\text{L}$  of *E. coli* strain, and 100  $\mu\text{L}$  of AgNPs ( $S1_{bac}$ ); (5) LB medium, 100  $\mu\text{L}$  of *E. coli* strain, and 100  $\mu\text{L}$  of AgNPs ( $S2_{bac}$ ); (6) LB medium, 100  $\mu\text{L}$  *E. coli* strain, and 100  $\mu\text{L}$  agave inulin

$C_{\text{AgNO}_3}$  is the concentration of  $\text{AgNO}_3$  (10 mM). Substituting as seen above,  $C_{\text{Ag}} = 1.07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  is obtained. Furthermore, dividing this concentration by the average mass, the nanoparticle concentration of  $\approx 2.9 \times 10^{14}$  nanoparticles/mL is obtained.

With this size distribution (Fig. 10) in comparison with the others, the procedure for obtaining the number of nanoparticles is more precise, because the nanoparticles present a narrower size distribution.

Figure 11 presents test tubes with dilutions to study the bactericidal effect according with the order shown in Table 5 (in the experimental section). Tube 1, containing only LB, represents the sterility group or the positive control, and tubes 2, 3, 5, and 6 show the bacterial growth. A solution of 100  $\mu\text{L}$  of agave inulin was added to tubes 3, and 6 to verify the absence of the antibacterial effect by agave inulin. In addition, 100  $\mu\text{L}$  of  $S1_{bac}$  and  $S2_{bac}$  were added to tubes 4 and 5, respectively. Tube 4 showed a clear bactericidal effect on the *E. coli* bacterium because there was not observed turbidity. This indicated that the sample  $S1_{bac}$  caused the damage to the bacterium where this sample was prepared with the highest concentration of  $\text{AgNO}_3$ ; hence, the concentration of silver nanoparticles had an effect against the *E. coli*. In consequence, sample  $S1_{bac}$  is going to be used for further analysis against the *E. coli* bacterium.

Although the bactericidal mechanisms of silver ions are not well understood, it is inferred that they include binding and interaction mechanisms

of silver nanoparticles with the cell wall and membrane [35]. It has been shown that there is electrostatic attraction between the negatively charged cell membrane of the bacteria and the positively charged silver nanoparticles, so the bactericidal activity is directly related to the positive charge of the silver ions [36, 37].

The bactericidal activity of AgNPs has been reported on Gram-negative bacteria such as *E. coli*. In this case, the concentration of silver nanoparticles is related to the formation of “holes” in the bacterial cell wall, and the accumulation of AgNPs in the cell membrane is related to the increase in the permeability of the bacterium, which triggers its death [38]. Another mechanism suggests that silver depletion could trigger the progressive release of lipopolysaccharides and cell membrane proteins, leading to the formation of “holes” [39]. It has also been proposed that silver ions released from silver nanoparticles can inactivate DNA replication and cause inhibition of enzyme functions as a result of their interaction with phosphorus moieties in DNA [40].

## 4. Conclusions

Silver nanoparticles were prepared in agave inulin using an eco-friendly, economical, and simple method.

According to the position and intensity of the absorption peak, high nanoparticle formation was obtained in 40 minutes using 20 mg/mL of agave

inulin, 1 mM of AgNO<sub>3</sub>, at T = 23°C and pH = 12. Nevertheless, a significant bactericidal effect was obtained with the sample containing 60 mg/mL of agave inulin, 10 mM of AgNO<sub>3</sub>, and the same temperature and pH.

### Acknowledgements

Authors want to thank the technical assistance of Francisco Ruiz Medina and Daniel Barron Pastor with the TEM (CNYN-UNAM)). As well as financial support from Universidad de Guadalajara under programs pro-SNI and PROINPEP; María Teresa Sánchez Vieyra wants to thank National Council of Science and Technology (CONACYT-México) for its PhD scholarships.

### References

- [1] Mishra S, Singh HB. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(3):1097–107. doi: 10.1007/s00253-014-6296-0
- [2] Sánchez-Rojo SA, Martínez-Zerega BE, Velázquez-Pedroza EF, Martínez-Espinosa J. C, Torres-González L. A, Aguilar-Lemarroy A, et al. Cervical cancer detection based on serum sample surface enhanced Raman spectroscopy. *Rev Mex Fis.* 2016;62(3):213–8.
- [3] Téllez GL, Luckie RAM, Mejía OFO, Mendieta VS, Reyes JT, Guerrero VV, et al. *Nanoestructuras metálicas.* 1st ed. México: Reverté; 2013.
- [4] Firdhouse MJ, Lalitha P. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. *J Nanotechnol.* 2015;2015: 1–18. doi: 10.1155/2015/829526
- [5] Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J Adv Res.* 2016;7(1):17–28. doi: 10.1016/j.jare.2015.02.007
- [6] Gardea-Torresdey JL, Gomez E, Peralta-Videa JR, Parsons JG, Troiani H, Jose-Yacamán M. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir.* 2003;19(4):1357–61. doi: 10.1021/la020835i
- [7] Poulouse S, Panda T, Nair PP, Theodore T. Biosynthesis of silver nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(2):2038–49. doi: 10.1166/jnn.2014.9019
- [8] Bordoloi M, Sahoo RK, Tamuli KJ, Saikia S, Dutta PP. Plant extracts promoted preparation of silver and gold nanoparticles: a systematic review. *Nano.* 2020;15(02):1–24. doi: 10.1142/S1793292020300017
- [9] Oseguera-Galindo DO, Ocegüera-Contreras E, Pozas-Zepeda D. Silver nanoparticles synthesis using biomolecules of habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as a reducing agent. *J Nat Prod.* 2020;14(3): 036012–036012. doi: 10.1117/1.JNP.14.036012
- [10] Justo MB, Oropeza LG, Hernández RS, Negrete LP. Azúcares en agaves (Agave tequilana Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Univ.* 2001;11(1):33–8. doi: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41611105
- [11] Handa C, Goomer S, Siddhu A. Physicochemical properties and sensory evaluation of fructooligosaccharide enriched cookies. *J Food Sci.* 2012;49(2):192–9. doi: 10.1007/s13197-011-0277-4
- [12] Sánchez-Vieyra MT. Estudio de condiciones físicas y químicas en la biosíntesis de nanopartículas de plata usando infusión de chía (*Salvia hispánica*) e inulina de agave. Master's Degree Thesis. Guadalajara, México: University of Guadalajara; 2020.
- [13] Hughes SR, Qureshi N, López-Núñez JC, Jones MA, Jarodsky JM, Galindo-Leva LA, et al. Utilization of inulin-containing waste in industrial fermentations to produce biofuels and bio-based chemicals. *World J Microbiol Biotechnol.* 2017;33(78):1–15. doi: 10.1007/s11274-017-2241-6
- [14] Barclay T, Ginic-Markovic M, Cooper P, Petrovsky N. Inulin—a versatile polysaccharide: use as food chemical and pharmaceutical agent. *J Excip Food Chem.* 2010;1(3):27–50.
- [15] Montañez-Soto J, Venegas-González J, Vivar-Vera M, Ramos-Ramírez E. Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul. *Bioagro.* 2011;23(3):199–206.
- [16] Lara-Fiallos M, Lara-Gordillo P, Julián-Ricardo MC, Pérez-Martínez A, Benítez-Cortés I. Avances en la producción de inulina. *Tecnología Química.* 2017;37(2): 352–66.
- [17] Parvekar P, Palaskar J, Metgud S, Maria R, Dutta S. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater Investig Dent.* 2020;7(1):105–9. doi: 10.1080/26415275.2020.1796674
- [18] Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *Rsc Adv.* 2014;4(8):3974–83. doi: 10.1039/c3ra44507k
- [19] Oseguera-Galindo DO, Ceja-Andrade I, Martínez-Benítez A, Gómez Rosas G, Chávez-Chávez A, Pérez-Centeno A, Santa-Aranda MA. Overlapping of laser pulses and its effect on the yield of silver nanoparticles in water. *J Mater Sci Eng B.* 2014;4(10):279–83. doi: 10.17265/2161-6221/2014.10.002
- [20] Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem.* 2007;79(11):4215–21. doi: 10.1021/ac0702084
- [21] Krishnaraj C, Ramachandran R, Mohan K, Kalaichelvan PT. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. *Spectrochim. Acta A Mol Biomol.* 2012;93:95–9. doi: 10.1016/j.saa.2012.03.002
- [22] Baghizadeh A, Ranjbar S, Gupta VK, Asif M, Pourseyedi S, et al. Green synthesis of silver

- nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase. *J Mol Liq.* 2015;207:159–63. doi: 10.1016/j.molliq.2015.03.029
- [23] Verma A, Mehata MS. Controllable synthesis of silver nanoparticles using Neem leaves and their antimicrobial activity. *J Radiat Res Appl Sci.* 2016;9(1):109–15. doi: 10.1016/j.jrras.2015.11.001
- [24] Jain S, Mehata MS. Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–13. doi: 10.1038/s41598-017-15724-8
- [25] Findley ME. Modified one-at-a-time optimization. *AIChE J.* 1974;20(6):1154–60. doi: 10.1002/aic.690200614
- [26] Bhowmik S, Das T, Ghosh S, Sharma BK, Majumdar S, De UC. Synthesis of some new chrysin derivatives and their biological assessment as antibacterial, antibiofilm and antifungal agents. *Asian J. Chem.* 2018;30(3):693–702. doi: 10.14233/ajchem.2018.21167
- [27] Oseguera-Galindo DO, Martínez-Benitez A, Chavez-Chavez A, Gomez-Rosas G, Perez-Centeno A, Santana-Aranda MA. Effects of the confining solvent on the size distribution of silver NPs by laser ablation. *J Nanopart Res.* 2012;14(9):1–6. doi: 10.1007/s11051-012-1133-9
- [28] Autino JC, Romanelli GP, Ruiz DM. Introducción a la química orgánica. 1st ed. La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP); 2013.
- [29] Zhang W, Xu W, Li J, Liu H, Li Y, Lou Y, et al. Comparative catalytic and bacteriostatic properties of silver nanoparticles biosynthesized using three kinds of polysaccharide. *AIP Adv.* 2018;8(6):1–8. doi: 10.1063/1.5034479
- [30] Marciniak L, Nowak M, Trojanowska A, Tylkowski B, Jastrzab R. The effect of pH on the size of silver nanoparticles obtained in the reduction reaction with citric and malic acids. *Materials.* 2020;13(23):1–12. doi: 10.3390/ma13235444
- [31] Herrera E, Álvarez MDPR, Salom PR, Arribas MV. *Bioquímica básica.* 1st ed. España SL: Elsevier; 2014.
- [32] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10):2346–53. doi: 10.1088/0957-4484/16/10/059
- [33] Ma L, Su W, Liu J-X, Zeng X-X, Huang Z, Li W, et al. Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Penicillium aculeatum* Su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions. *Mater Sci Eng.* 2017;77:963–71. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.294
- [34] Maldonado-Vega M, Guzmán D, Camarena-Pozos DA, Castellanos-Arévalo AP, Salinas Ramírez A, Garibo D, Bogdanchikova N. Application of silver nanoparticles to reduce bacterial growth on leather for footwear manufacturing. *J Appl Res. Technol.* 2021;19(1):41–8.
- [35] Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed Nanotechnol Biol Med.* 2007;3(1):95–101. doi: 10.1016/j.nano.2006.12.001
- [36] Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicro. Agents Chemother.* 2002;46(8):2668–70. doi: 10.1128/AAC.46.8.2668-2670.2002
- [37] Hamouda T, Myc A, Donovan B, Shih AY, Reuter JD, Baker JR. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. *Microbiol Res.* 2001;156(1):1–7. doi: 10.1078/0944-5013-00069
- [38] Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. Coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004;275(1):177–82. doi: 10.1016/j.jcis.2004.02.012
- [39] Amro NA, Kotra LP, Wadu-Mesthrige K, Bulychev A, Mobashery S, Liu GY. High-resolution atomic force microscopy studies of the *Escherichia coli* outer membrane: structural basis for permeability. *Langmuir.* 2000;16(6):2789–96. doi: 10.1021/la991013x
- [40] Gupta P, Bajpai M, Bajpai SK. Investigation of antibacterial properties of silver nanoparticle-loaded poly (acrylamide-co-itaconic acid)-grafted cotton fabric. *J Cotton Sci.* 2008;12(3):280–6.

Received 2023-07-03

Accepted 2023-11-25